



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2017

**Ana Filipa Correia  
Santos Rufino**

**Formação de agregados proteicos na presença de  
líquidos iónicos e a aplicação de simulações de  
dinâmica molecular**



**Ana Filipa Correia  
Santos Rufino**

**Formação de agregados proteicos na presença de  
líquidos iónicos e a aplicação de simulações de  
dinâmica molecular**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Sérgio Miguel Fernandes dos Santos, Investigador Auxiliar do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro, e da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro.

*"If you only walk on sunny days, you will never reach your destination."*  
Paulo Coelho

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues  
professor auxiliar, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Cátia Andreia Silva Teixeira  
investigadora auxiliar, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de  
Ciências, Universidade do Porto

Doutor Sérgio Miguel Fernandes dos Santos  
investigador auxiliar, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Doutor Sérgio Santos e à Doutora Mara Freire por toda a ajuda, paciência, partilha de conhecimento e tempo disponibilizado ao longo deste ano.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas André, Joana e José por toda a ajuda na parte computacional deste trabalho e ao Dibyendu e Mukesh por toda a ajuda na parte laboratorial e aos restantes membros do PAtH, especialmente à Rita, Márcia e Maria João.

Às amigas que Aveiro formou, um muito obrigada por estes cinco anos, especialmente à Ana Cristina, Andreia, Cristina, Carmen, Diana e Nicole, por me terem feito acreditar no lema “nunca se desiste”, e também à Ana Vasconcelos, Cátia, Inês Mota e Santos, Joana, Patrícia e Simão, em conjunto com todos os outros que me fizeram sentir em casa nesta cidade, sem vocês não teria sido a mesma coisa.

Às que permaneceram sempre comigo, um obrigado muito especial à Ana, Débora, Joana e Juliana, por todo o apoio. E também ao Diogo e à Nádia, por todas as vezes que me fizeram repetir o que eu estava a fazer, por todo o apoio e confiança em mim, um muito obrigada por tudo.

E finalmente agradeço à minha família, aos meus pais, que me permitiram chegar até aqui, que me ajudaram e apoiaram em todos os momentos e acreditaram em mim.

## palavras-chave

Agregados amilóides, agregados amorfos, fibrilas, beta amilóide, ovalbumina, líquidos iônicos, dinâmica molecular, simulações.

## resumo

O estudo do mecanismo de formação de agregados proteicos é atualmente alvo de interesse devido à sua frequente relação com doenças neurológicas como o Alzheimer, mas também devido às suas características estruturais e mecânicas relevantes para aplicação em diversas áreas. Devido ao facto da mesma proteína poder dar origem a diferentes tipos de agregados dependendo do meio em que se encontra inserida, é necessário perceber a influência dos vários fatores na formação destes e o seu mecanismo de formação. Visando estes objetivos, neste trabalho, foram usadas proteínas e fragmentos modelo, nomeadamente o fragmento do peptídeo  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , bem caracterizado na literatura como modelo para o estudo de formação de fibrilas amilóides, e a ovalbumina, em conjunto com dois fragmentos da sua sequência e as proteínas totais da clara do ovo, para estudar a formação de agregados proteicos na presença de líquidos iônicos (LIs). Os LIs, nomeadamente o arginato de colínio ([Cho][Arg]) e tosilato de colínio ([Cho][Tos]), foram estudados como solventes indutores da agregação *in vitro* sob condições controladas. A formação de agregados foi avaliada laboratorialmente a pH 2 e pH 7, por técnicas de microscopia e ensaios de fluorescência por Tioflavina T, em conjunto com simulações de dinâmica molecular que permitiram estudar a estabilidade dos agregados proteicos. Verificou-se a formação de fibrilas de ovalbumina com características não amilóides na presença de [Cho][Arg] a 0,05 M a pH 2, tendo sido também verificada a formação de agregados com estrutura amorfa, mas com presença de folhas- $\beta$  locais, com [Cho][Tos] a 0,05 M a pH 2. Os restantes agregados para a ovalbumina e o fragmento em estudo para pH 2 e 7 visualizados por microscopia apresentaram morfologia amorfa. No caso da estabilidade das fibrilas por simulações de dinâmica molecular verificou-se a existência de ligações por pontes de hidrogénio inter-cadeia, estabilizando a estrutura, e interações dos líquidos iônicos com os aminoácidos da proteína. Encontraram-se diferentes áreas de superfície acessível ao solvente relacionadas com a estrutura secundária amorfa ou com folhas- $\beta$  locais, enquanto que pelo cálculo da energia de associação da estrutura formada foi possível concluir que nos sistemas com líquidos iônicos não existe uma conformação prevalente, sendo necessários estudos adicionais.

## keywords

Amyloid-aggregate, amorphous-aggregate, fibrils,  $\beta$ -amyloid, ovalbumin, ionic liquids, molecular dynamics, simulations

## abstract

The study of the mechanism of formation of protein aggregates is of high interest due to its frequent relationship with neurological diseases such as Alzheimer's, but also due to their structural and mechanical characteristics relevant for application in several areas. Since the same protein can give rise to different types of aggregates, depending on the medium in which it is inserted, it is necessary to perceive the influence of the various factors in the formation of these and their mechanisms of formation. Envisioning these objectives, in this work, model proteins and fragments were used, namely the beta amyloid peptide fragment  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , well characterized in the literature as a model for the study of amyloid fibril formation, and ovalbumin, together with two fragments of its sequence and total proteins of the egg white, to study the formation of protein aggregates in the presence of ionic liquids (ILs). ILs, namely choline arginate ([Cho][Arg]) and choline tosylate ([Cho][Tos]), were studied as solvents that could allow *in vitro* aggregation under controlled conditions. The formation of the aggregates was experimentally evaluated at pH 2 and pH 7, by microscopy and fluorescence tests by Thioflavin T, together with molecular dynamics simulations that allowed the study of the stability of the protein aggregates. It was found the formation of fibrils with non-amyloid characteristics for ovalbumin in the presence of 0.05 M of [Cho][Arg] at pH 2, and also the formation of aggregates with amorphous structure but with presence of  $\beta$ -sheets sites for the solution of [Cho][Tos] at 0.05 M and pH 2. The remaining aggregates for ovalbumin and the study fragment at pH 2 and 7 displayed amorphous morphology. In the case of the stability of the fibrils by simulations of molecular dynamics, it was verified the existence of inter-chain hydrogen bonds, stabilizing the protein structure, and interaction of ILs with the amino acids of the protein. The different solvent accessible surface areas are related to the amorphous secondary structure or with local  $\beta$ -sheets, and by the calculation of the energy of association of the formed structure it was possible to conclude that in the systems with ILs there is no prevailing conformation, and additional studies are required.

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	Agregação proteica.....	1
1.1.1	Agregados amilóides .....	4
1.1.2	Agregados amorfos .....	8
1.2	Beta amilóide .....	9
1.3	Ovalbumina .....	10
1.4	Líquidos iônicos .....	13
1.5	Simulações de dinâmica molecular .....	14
1.5.1	Proteínas .....	15
1.5.2	Líquidos iônicos .....	16
1.5.3	Métodos de simulação de dinâmica molecular.....	18
1.5.4	Etapas da simulação MD.....	19
1.5.5	Campo de forças .....	22
1.5.6	Algoritmos.....	24
1.5.6.1	Temperatura e pressão constante.....	24
1.5.6.2	Minimização de energia/Otimização de estruturas.....	26
1.5.7	Caixa de simulação e condições de simulação .....	27
1.6	Objetivo da dissertação .....	28
2.	Materiais e Métodos .....	29
2.1	Metodologia laboratorial .....	29
2.1.1	Síntese de líquidos iônicos .....	30
2.1.1.1	[Cho][Arg].....	30
2.1.1.2	[Cho][Tos] .....	30
2.1.2	Preparação das soluções com o fragmento do peptídeo beta amilóide e líquidos iônicos .....	31
2.1.3	Preparação das soluções com a proteína ovalbumina e líquidos iônicos .....	31
2.1.4	Preparação das soluções com as proteínas totais da clara de ovo com líquidos iônicos .....	32
2.1.5	Microscopia.....	32
2.1.6	Ensaio de Fluorescência com Tioflavina T (ThT).....	32
2.2	Metodologia Computacional .....	33
2.2.1	Algoritmo PASTA 2.0.....	33
2.2.2	Preparação de estruturas.....	33



2.2.3	Preparação de sistemas.....	34
3.	Resultados e Discussão .....	37
3.1	Microscopia.....	37
3.1.1	Estudo da agregação do fragmento da proteína A $\beta$ <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> .....	37
3.1.2	Estudo da agregação da ovalbumina .....	43
3.1.2.1	Soluções com arginato de colínio ([Cho][Arg]) .....	43
3.1.2.2	Soluções com tosilato de colínio ([Cho][Tos]) .....	47
3.1.3	Estudo da agregação das proteínas totais da clara de ovo com líquidos iônicos.....	51
3.2	Ensaio de fluorescência com Tioflavina T (ThT) .....	53
3.3	Seleção dos fragmentos da ovalbumina para o estudo de MD .....	56
3.4	Avaliação das ligações de hidrogénio inter-cadeias proteicas .....	58
3.5	Cálculo da distância mínima entre componentes do líquido iónico e aminoácidos .....	63
3.6	SASA (Solvent accessible surface area) .....	72
3.7	MM-PBSA (Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area) .....	75
4.	Conclusões e trabalho futuro.....	79
5.	Bibliografia .....	81
	Anexos.....	91

## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação do processo de enrolamento proteico por funil energético. No topo do funil encontra-se o estado não enrolado com alta energia (representada por E), a azul encontram-se vários estados intermédios até ao estado nativo, e a rosa encontram-se as possíveis associações de conformações intermédias que podem resultar em agregados. Adaptado de [3].	2
Figura 2 - Imagem de microscopia de transmissão de fibrilas amilóides longas e não ramificadas [29].	5
Figura 3 - Formação cinética de uma fibrila amilóide. O crescimento da fibrila é descrito por uma curva sigmoidal, que contempla uma etapa de nucleação, uma de crescimento, e o equilíbrio. Adaptado de [32].	6
Figura 4 - Imagem de microscopia de transmissão de agregados desordenados de morfologia amorfa [29].	8
Figura 5 - Representação do fragmento do peptídeo beta amilóide <sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup> obtida por recurso à estrutura em PDB “3OW9” pelo PyMol, com estruturas em loop identificadas com cor verde e folha-β com cor vermelha.	10
Figura 6 - Representação da estrutura terciária da ovalbumina obtida por recurso à estrutura em PDB “1OVA” pelo PyMol, com estruturas em loop identificadas com cor verde, α-hélices com cor azul e folha-β com cor vermelha.	12
Figura 7 - Número de publicações existentes no Scopus encontradas por pesquisa usando as palavras chave “Proteins and molecular dynamics”, “Ionic liquids and molecular dynamics” e “Proteins and ionic liquids and molecular dynamics” nos últimos 10 anos; dados obtidos no dia 12 de Junho de 2017.	18
Figura 8 - Distensão das ligações químicas, representado por l. Adaptado de [130].	22
Figura 9 - Flexão de ângulos entre três átomos ligados. Adaptado de [130].	23
Figura 10 - Representação da torção periódica de uma ligação. Adaptado de [130].	23
Figura 11 - Representação da interação de van der Waals. Adaptado de [130].	24
Figura 12 - Representação da interação de Coulomb. Adaptado de [130].	24
Figura 13 - Representação da energia de cada conformação possível para uma molécula. Adaptado de [110].	26
Figura 14 - Estruturas químicas dos líquidos iónicos: (i) arginato de colínio [Cho][Arg]; (ii) tosilato de colínio, [Cho][Tos].	29
Figura 15 - Pentâmero constituído por cinco cadeias do fragmento <sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> de ovalbumina na conformação de folha-β antiparalela.	35
Figura 16 - Aspeto das soluções com o fragmento <sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup> a pH 2, no tempo t = 0 e 7 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo, soluções de [Cho][Arg] 0,05 e 0,5 M e de [Cho][Tos] 0,5 M.	38
Figura 17 - Evolução da formação de agregado proteicos do fragmento <sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup> no tempo t = 0, 1, 3 e 7 dias para o estudo a pH 2, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo, constituídas pelo fragmento peptídico da proteína Aβ e água a pH 2, e soluções [Cho][Arg] 0,05 M e 0,5 M e [Cho][Tos] 0,5 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 μm.	39

Figura 18 - Aspeto das soluções com o fragmento $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , inicialmente a pH 7, no tempo $t = 0$ e 3 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo, soluções de [Cho][Arg] 0,05 e 0,5 M e solução de [Cho][Tos] 0,5 M. ....	40
Figura 19 - Evolução da formação de agregado proteicos do fragmento $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ no tempo $t = 0$ , 1 e 3 dias para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo, [Cho][Arg] 0,05 M e 0,5 M e [Cho][Tos] 0,5 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	40
Figura 20 - Aspeto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 2, no tempo $t = 0$ e 6 dias respetivamente, estando representadas as soluções controlo, e soluções de [Cho][Arg] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente. ....	43
Figura 21 - Evolução da formação de agregado proteicos de ovalbumina no tempo $t = 0$ , 1, 3 e 6 dias para o estudo a pH 2 estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e soluções [Cho][Arg] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	44
Figura 22 - Aspeto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 7, no tempo $t = 0$ e 3 dias, estando representadas as soluções controlo e soluções [Cho][Arg] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente. ....	45
Figura 23 - Evolução da formação de agregados proteicos de ovalbumina no tempo $t = 0$ , 1 e 3 dias para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e [Cho][Arg] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	46
Figura 24 - Aspeto das soluções de ovalbumina, inicialmente a pH 2, no tempo $t = 0$ e 6 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo e soluções [Cho][Tos] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente. ....	47
Figura 25 - Evolução da formação de agregado proteicos de ovalbumina no tempo $t = 0$ , 1, 3 e 6 dias, para o estudo a pH 2, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e [Cho][Tos] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	48
Figura 26 - Aspeto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 7, no tempo $t = 0$ e 3 dias, estando representadas as soluções controlo e soluções [Cho][Tos] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente. ....	49
Figura 27 - Evolução da formação de agregado proteicos de ovalbumina no tempo $t = 0$ , 1 e 3 dias, para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e [Cho][Tos] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	49
Figura 28 - Aspeto das soluções com as proteínas totais da clara do ovo, inicialmente a pH 2 no tempo $t = 0$ e 3 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo e [Cho][Arg] 0,05, 0,5 e 1 M, respetivamente. ....	52
Figura 29 - Evolução da formação de agregados das proteínas totais da clara do ovo no tempo $t = 0$ , 1 e 3 dias a pH 2 inicial, para as soluções controlo e soluções [Cho][Arg] 0,05, 0,5 e 1 M, usando uma ampliação de 10x, imagens com escala incorporada equivalente a 100 $\mu\text{m}$ . ....	52
Figura 30 - Estrutura da Tioflavina T, sonda fluorescente, que exibe um pico aos 482 nm quando se liga a estruturas com conformação em folha- $\beta$ . ....	53
Figura 31 - Intensidade da emissão de fluorescência da ThT a 482 nm em função do tempo para a ovalbumina no sistema: A-controlo, B-[Cho][Arg] 0,05 M e C-[Cho][Tos] 0,05 M. ....	55
Figura 32 - Exemplo de ligações de hidrogénio entre backbone de duas cadeias do fragmento da proteína A $\beta$ , $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , com a distância apresentada em Å. ....	59

Figura 33 - Critérios para a existência de uma ligação de hidrogénio, estando representado o átomo H, um dador, letra D, aceitador, letra A, r a distância entre o dador e o aceitador, e o ângulo $\alpha$ , formado entre os três elementos.....	59
Figura 34 - Número de ligações de hidrogénio intermoleculares e número de pares de átomos (aceitador e dador) a distância inferior a 0,35 nm, mas que não se encontram a ângulo adequado para formar ligações de hidrogénio para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> .....	60
Figura 35 - Número de ligações de hidrogénio e número de pares de átomos (aceitador e dador) a distância inferior a 0,35 nm, mas que não se encontram a ângulo adequado para formar ligações de hidrogénio para os sistemas com o líquido iónico [Cho][Arg] e [Cho][Tos] do pentâmero constituído pela sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> .....	61
Figura 36 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> da proteína A $\beta$ e os componentes do líquido iónico, iões [Cho] <sup>+</sup> e [Arg] <sup>-</sup> .....	64
Figura 37 - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido fenilalanina da quinta posição da sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a fenilalanina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).....	65
Figura 38 - Distância em Å, entre o anião arginato (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido lisina da sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião colínio a laranja e para a lisina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).....	66
Figura 39 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> e os componentes de líquido iónico, iões colínio e arginato.....	67
Figura 40 - Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].....	73

## Anexo B

Figura B. 1 - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência <sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> .....	92
Figura B. 2 - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para os sistemas com os dois líquidos iónicos do pentâmero constituído por <sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> .....	93
Figura B. 3 - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> .....	94
Figura B. 4 - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para os sistemas com os dois líquidos iónicos do pentâmero constituído pela sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> .....	95

## Anexo C

Figura C. 1 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ da proteína A $\beta$ e os componentes do líquido iônico, íões colínio e tosilato. ....	96
Figura C. 2 - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido alanina da sequência $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ (a azul) pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a alanina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho). ....	97
Figura C. 3 - Distância em Å, entre o anião tosilato (a laranja) constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido lisina da sequência $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ (a azul) pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião tosilato a laranja e para a lisina azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo). ....	97
Figura C. 4 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ e os componentes de líquido iônico, íões colínio e tosilato. ....	98
Figura C. 5 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da ovalbumina e os componentes do líquido iônico, íões colínio e arginato. ....	99
Figura C. 6 - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja) constituinte do líquido iônico [Cho][Arg] e o aminoácido glutamato da sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para o glutamato a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho). ....	100
Figura C. 7 - Distância apresentada em Å, entre o anião arginato (a laranja) constituinte do líquido iônico [Cho][Arg] e o aminoácido arginina da sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião arginato a laranja e para a arginina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho). ....	100
Figura C. 8 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da proteína ovalbumina e os componentes de líquido iônico, íões colínio e arginato. ....	101
Figura C. 9 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da proteína ovalbumina e os componentes do líquido iônico, íões colínio e tosilato. ....	102
Figura C. 10 - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido glutamato da sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para o glutamato a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho). ....	103
Figura C. 11 - Distância em Å, entre o anião tosilato (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido serina da posição quatro da sequência $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião tosilato a laranja e para a serina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo). ....	103
Figura C. 12 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência	

<sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> da ovalbumina e os componentes de líquido iónico, iões colínio e tosilato.....	104
Figura C. 13 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> da proteína ovalbumina e os componentes do líquido iónico, iões colínio e arginato .....	105
Figura C. 14 - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido glicina da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a glicina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).....	106
Figura C. 15 - Distância em Å, entre o anião arginato (a laranja), constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido lisina da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> (a azul) pertencente cadeia 1 do pentâmero aos 50 ns de simulação (átomos de carbono para o anião arginato a laranja e para a lisina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).....	106
Figura C. 16 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> e os componentes de líquido iónico, iões colínio e arginato.....	107
Figura C. 17 - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> e os componentes do líquido iónico, iões colínio e tosilato. ....	108
Figura C. 18 - Distância apresentada em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iónico [Cho][Tos] e os aminoácidos valina e metionina da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> (a azul) pertencente à cadeia dois do pentâmero, aos 46 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a valina e metionina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).....	109
Figura C. 19 - Distância apresentada em Å, entre dois aniões tosilato (a azul), constituinte do líquido iónico [Cho][Tos] e o aminoácido asparagina da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 46 ns da simulação (átomos de carbono para os aniões tosilato a laranja e para a asparagina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).....	109
Figura C. 20 - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> e os componentes de líquido iónico, iões colínio e tosilato.....	110

## Anexo D

Figura D. 1- Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com <sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> , A- para o sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], e C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].....	111
Figura D. 2- Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o [Cho][Tos].....	112

Figura D. 3- DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências <sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup> , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos]. .....	113
Figura D. 4- DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências de <sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup> , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos]. .....	114
Figura D. 5- DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências de <sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup> , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos]. .....	115

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição e características físico-químicas das proteínas maioritárias da clara do ovo [59], [60]. .....	11
Tabela 2- Constituição dos sistemas computacionais utilizados, estando representado o número de aminoácidos por “Nº AA”, o número de moléculas de água, líquido iónico e iões e o respetivo número total de moléculas para cada sistema, juntamente com o número de átomos total.....	35
Tabela 3- pH das soluções após 7 dias da sua preparação para o estudo efetuado a pH 2 e após 3 dias para o estudo efetuado a pH 7 do fragmento <sup>16</sup> KL VFFA <sup>21</sup> da proteína Aβ com os líquidos iónicos [Cho][Arg] e [Cho][Tos]. .....	42
Tabela 4 - pH das soluções após 6 dias da sua preparação para o estudo a pH 2, e após 3 dias para o estudo realizado a pH 7, para a ovalbumina com o líquido iónico [Cho][Arg]. .....	46
Tabela 5 - pH das soluções após 6 dias da sua preparação para o estudo a pH 2 e após 3 dias para o estudo realizado a pH 7 para a proteína ovalbumina com o líquido iónico [Cho][Tos].....	50
Tabela 6 - pH das soluções após 3 dias da sua preparação para o estudo a pH 2 para as proteínas totais da clara do ovo com o líquido iónico [Cho][Arg]. .....	53
Tabela 7 - Dados de fragmentos da sequência total da proteína ovalbumina, com número de aminoácidos (AA) hidrofóbicos, a sua percentagem na sequência e a melhor energia para a fibrilação, estando também apresentados os dados para o fragmento do peptídeo beta amiloide, para efeitos de comparação (dados obtidos pelo algoritmo Pasta 2.0 no dia 5 de Junho de 2017). .....	57
Tabela 8 - Energias livres de ligação médias em kcal/mol com o desvio-padrão associado no final dos 50 ns de simulação, para todos os sistemas em estudo (46 ns para o sistema com o pentâmero do segundo fragmento de ovalbumina e [Cho][Tos]), utilizando duas abordagens diferentes para o cálculo do MM-PBSA, mudança na constante dielétrica do solvente e alteração no raio e concentração das espécies carregadas. ....	77

### Anexo A

Tabela A. 1 - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05 e 0,5 M de [Cho][Arg] e 0,5 M de [Cho][Tos] nos sistemas com o fragmento de Aβ16-21 e água pH 2/PBS, com uma incerteza associada de ± 0,05 mg. ....	91
Tabela A. 2 - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M de [Cho][Arg] e [Cho][Tos] nos sistemas com a proteína ovalbumina e água pH 2/PBS, respetivamente, com uma incerteza associada de ±0,05 mg. ....	91
Tabela A. 3 - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M de Arginato de colínio nos sistemas com as proteínas totais da clara do ovo e água pH 2, com uma incerteza associada de ± 0,05 mg. ....	91



## Lista de abreviaturas:

**A $\beta$**  – Beta amilóide

**AMBER** - *Assisted Model Building with Energy Refinement*

**CHARMM** - *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*

**DC** - Dicroísmo circular

**F.d.p** - Função densidade de probabilidade

**FTIR** – *Fourier Transform Infrared Radiation*

**GAFF** - *General Amber Force Field*

**LI**- Líquido iônico

**MC** - Monte Carlo

**MD** - Dinâmica molecular

**MM** - Mecânica molecular

**MM-PBSA** - *Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*

**QM** - Mecânica quântica

**NpT** - Partículas, pressão e temperatura constantes

**NVT** - Partículas, volume e temperatura constantes

**OPLS** - *Optimized Potentials for Liquid Simulations*

**PBS**- Tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate-buffered saline*)

**pI**- Ponto isoelétrico

**PEU**- *Pasta energy units*

**PME** - *Particle mesh Ewald*

**RESP** - *Restrained ElectroStatic Potential*

**RMN** - Ressonância magnética nuclear

**SASA** – *Solvent Accessible Surface Area*

**ThT** – Tioflavina T

**[C<sub>2</sub>mim]Cl** - Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio

**[C<sub>1</sub>mim]Cl** - Cloreto de 1,3-dimetilimidazólio

**[C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim]Cl** - Cloreto de 1,2,3-trimetilimidazólio

**[C<sub>2</sub>mim][PF<sub>6</sub>]** - Hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazólio

**[C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim][PF<sub>6</sub>]** - Hexafluorofosfato de 1,2,3-trimetilimidazólio

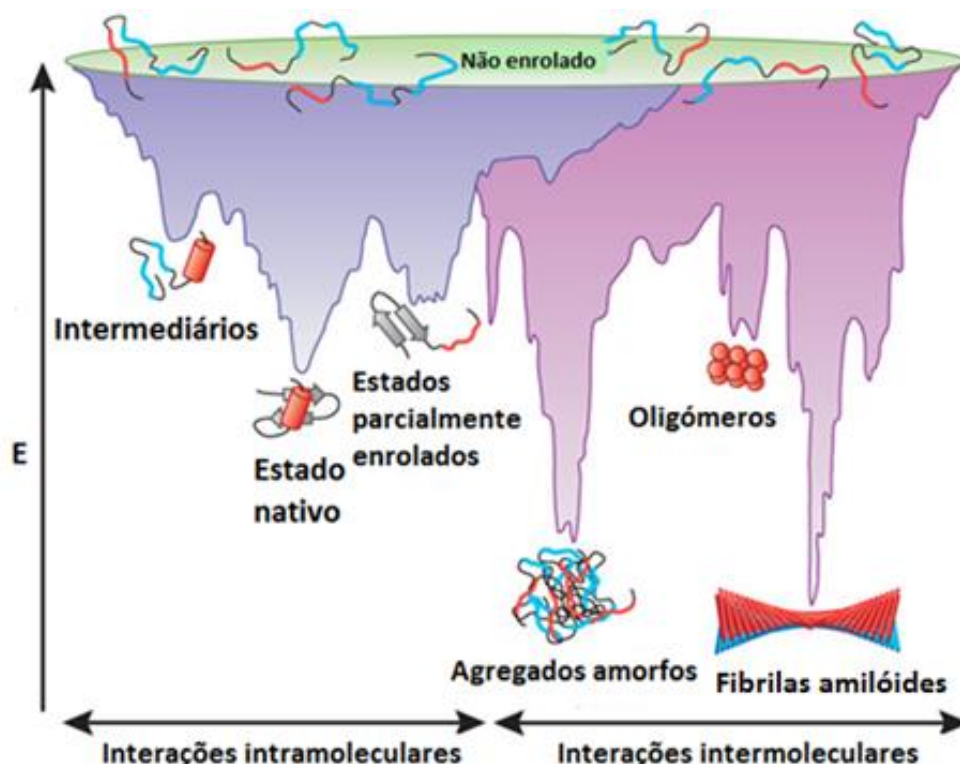
**[Cho][Arg]**- Arginato de colínio

**[Cho][Tos]** - Tosilato de colínio

# **1. Introdução**

## **1.1 Agregação proteica**

As proteínas são macromoléculas complexas que podem apresentar várias conformações, mas são dependentes de uma estrutura tridimensional ordenada para executar a sua função [1]. A função da cada proteína depende de um enrolamento correto para que seja alcançada a conformação ideal sendo, geralmente, esta a conformação mais estável em termos de energia livre de Gibbs. Existem proteínas que mesmo em ambiente fisiológico não conseguem alcançar esta conformação, o que leva à formação de espécies intermediárias e não nativas que se podem associar, originando agregados proteicos [2]. Para que o estado nativo possa ser formado é necessário que ocorra uma estabilização, visto que o estado desnaturado possui geralmente uma entropia conformacional elevada devido às inúmeras conformações que pode adotar. As forças que favorecem a formação do estado nativo podem ser tanto intermoleculares como intramoleculares, e para alcançar a conformação de menor energia, estado nativo, podem ser detetadas várias conformações intermédias e por isso diferentes percursos podem alcançar a mesma conformação [3]. Este processo pode ser representado por um funil em que as conformações com elevada energia se encontram no topo deste, estando na forma desnaturada, e por isso apresentam uma entropia conformacional elevada, enquanto que no fundo do funil é encontrado o estado nativo com um estado de energia mínimo, devido à estabilização entálpica e também vários agregados formados por associação entre estados proteicos intermediários (Figura 1).



**Figura 1** - Representação do processo de enovelamento proteico por funil energético. No topo do funil encontra-se o estado não enovelado com alta energia (representada por E), a azul encontram-se vários estados intermediários até ao estado nativo, e a rosa encontram-se as possíveis associações de conformações intermediárias que podem resultar em agregados. Adaptado de [3].

Os agregados formados *in vivo* ou *in vitro* podem ser devidos a diversos fatores, como mudanças de temperatura, *stress* oxidativo, concentração de proteína, natureza dos solventes e através de modificações químicas nas proteínas [4]. Por exemplo, mudanças na temperatura levam frequentemente a uma destabilização da estrutura proteica que pode ter como consequência um aumento da taxa de agregação. Assim, uma proteína que apresente uma taxa de agregação à temperatura ambiente, se sofrer um aumento da temperatura, este aumento poderá conduzir a uma aceleração na formação de agregados, havendo redução da energia de ativação, aumento das interações hidrofóbicas, aumento da difusão das proteínas e aumento da frequência das colisões moleculares [5]. Por outro lado, o pH da solução afeta a distribuição e o tipo de cargas da superfície das proteínas, afetando não só as interações intramoleculares no processo de enovelamento, mas também as interações intermoleculares proteína-proteína. A pH muito afastado de 7, as proteínas apresentam cargas elevadas, aumentando consideravelmente as interações intermoleculares e intramoleculares, o que leva no mínimo a um parcial desenrolamento da proteína. Perto do ponto isoelétrico (pI) a proteína tem o seu mínimo de solubilidade [5]. Para além da temperatura e do pH tem-se

também como fator externo a força iónica da solução, sendo que todos os iões presentes podem interagir com a proteína electrostaticamente, induzindo assim mudanças na sua conformação [6]. A forma como este fator afeta a agregação é muito dependente da proteína, sendo que se a neutralização das suas cargas superficiais favorecer a sua estabilidade/enrolamento, a redução destas interações por aumento da força iónica vai destabilizar a proteína, tendo como consequência a exposição de zonas hidrofóbicas, o que potencia a formação de agregados [7].

O processo de formação de agregados é variável com as condições do meio, mas conjuntamente com a conformação inicial da proteína, podendo esta encontrar-se na forma nativa, enrolada, não enrolada ou parcialmente enrolada [8]. A conformação proteica mais propensa para a agregação é a parcialmente enrolada, pois as suas regiões hidrofóbicas ficam expostas, apresentando uma cadeia polipeptídica pouco estruturada, o que promove as ligações por pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre diferentes cadeias polipeptídicas. Por outro lado, as conformações enroladas e não enroladas têm, respetivamente, as suas regiões hidrofóbicas sem contacto com a água ou dispersas aleatoriamente [3].

Os agregados proteicos podem ser classificados com base em diferentes propriedades, tais como solubilidade (sendo designados por solúveis se não forem visíveis a olho nu e não puderem ser removidos por filtro com tamanho de poro 0,22  $\mu\text{m}$ ), tipo de ligações estabelecidas, tamanho/morfologia, reversibilidade e conformação maioritária dos agregados (forma nativa ou desnaturada) [9], [10]. Os agregados apresentam diferentes tipos de organização tridimensional consoante as ligações estabelecidas entre as moléculas, podendo estas ser de natureza fraca não covalente, tais como *van der Waals*, ligações por pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas e hidrofóbicas [5], ou por ligações covalentes [11]. Normalmente, os agregados formados por tipos de ligação fracos são reversíveis, o que pode indicar um equilíbrio entre o monómero e as outras conformações [9]. Os agregados insolúveis podem apresentar uma configuração amorfa ou fibrilar, dependendo da natureza da proteína em questão e também das condições do meio. Existe ainda um estado proteico ordenado para além do nativo, sendo um estado caracterizado por agregados lineares, denominados de amilóides [12]. A formação deste tipo de agregado é geralmente prejudicial para um sistema vivo, que tende a desenvolver mecanismos para evitar a sua formação ou neutralizar os seus efeitos [13]. Apesar dos agregados do tipo fibrilar estarem

frequentemente relacionado a patologias, o mesmo pode acontecer com agregados amorfos.

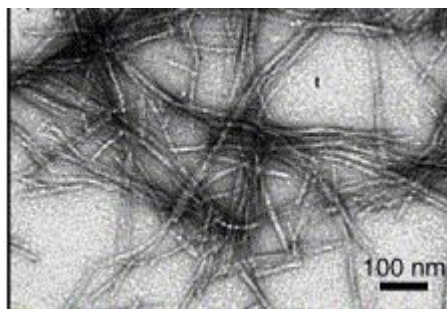
### 1.1.1 Agregados amilóides

As fibrilas proteicas, ou fibrilas amilóides, são estruturas com crescente interesse na área farmacêutica, essencialmente na procura de novos fármacos que combatam a sua formação dado que a formação de fibrilas amilóides é responsável por diversas doenças neurológicas, como o Alzheimer e o Parkinson [14]. Por outro lado, as fibrilas proteicas têm também elevado interesse na área alimentar [15], e na preparação de novos materiais pelas suas propriedades funcionais e mecânicas interessantes [16], [17]. É encontrada a sua aplicabilidade em vários exemplos, como em modelos funcionais, na formação de fios de tamanho nanométrico com capacidade de condução comparável à de fios condutores sólidos [18], e na produção de novos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com propriedades mecânicas desejáveis [19]. A resistência, rigidez e a sua energia coesiva fazem com que as fibrilas tenham uma resistência elevada a fenómenos de degradação químicos e biológicos, o que as faz materiais estruturais importantes com aplicabilidade em áreas diferentes, sendo dois destes exemplos, a lisozima e o peptídeo beta amilóide [20], [21].

As fibrilas obtidas pela agregação da lisozima foram aplicadas com sucesso na substituição de colagénio na produção de ossos artificiais, produzindo fibrilas amilóides de comprimento longo e não ramificadas [20]; também para a produção de nanotubos, nanocristais e nanopartículas, é possível utilizar como recurso as estruturas em forma de cavidade entre as folhas- $\beta$  das fibrilas produzidas pela lisozima, tendo a literatura já reportado a produção de nanotubos com aproximadamente 1 milímetro de diâmetro [21]. Para o caso do peptídeo beta amilóide foi verificado que as fibrilas amilóides podem ser utilizadas para a formação de hidrogéis com características termoreversíveis e não tóxicos, que podem ser usados como *scaffolds* que ajudam na diferenciação de células estaminais mesenquimais [22].

As fibrilas amilóides são estruturas fibrilares formadas por agregados de proteínas que atingem, normalmente, um comprimento na ordem dos micrómetros, e com diâmetro aproximado de 6-12 nanómetros (Figura 2) [23]. As fibrilas amilóides apresentam frequentemente propriedades comuns entre si, apresentando semelhanças na sua estrutura interna e na sua morfologia externa [24], [25]. As técnicas de dicroísmo circular (DC) e

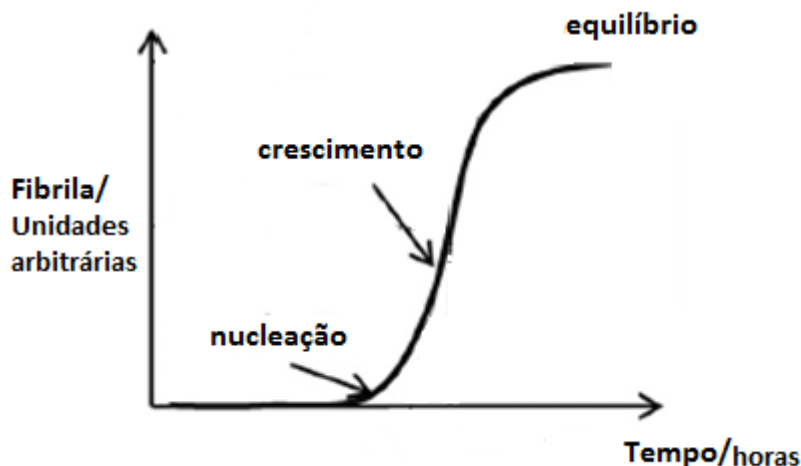
*Fourier Transform Infrared Radiation* (FTIR) permitem inferir sobre a existência de um teor elevado de folha- $\beta$  na sua constituição mesmo quando o monómero ou proteína têm um estado desordenado ou apresentam maioritariamente  $\alpha$ -hélice [25], [26]. Embora, ainda não tenha sido possível definir a estrutura molecular pormenorizada de uma fibrila amilóide, com recurso a microscopia eletrónica já foi possível verificar que apresentam uma estrutura longa, linear e não ramificada [27]. Estas fibrilas são constituídas normalmente por dois a seis protofilamentos, em que cada um apresenta um diâmetro de cerca de 2 nanómetros, e por dados de difração de raio-X verificou-se a existência de uma estrutura comum em folha- $\beta$  paralela ao eixo da fibrila, enquanto que cada cadeia individual em folha- $\beta$  encontra-se em configuração perpendicular ao eixo, sendo a distância entre folhas- $\beta$  de aproximadamente 10 Å [28].



**Figura 2** - Imagem de microscopia de transmissão de fibrilas amilóides longas e não ramificadas [29].

Existem vários mecanismos com algumas similaridades para a formação de fibrilas amilóides. Os monómeros proteicos têm tendência a associarem-se entre si em condições favoráveis ao fenómeno, formando agregados reversíveis, devido à sua superfície de auto-complementaridade que favorece as ligações intermoleculares. Estes pequenos agregados reversíveis podem-se transformar em irreversíveis por diversos fatores, tais como aumento da concentração de proteína, com formação de ligações covalentes [30]. Por outro lado, se a conformação inicial do monómero tiver sofrido alteração por fatores como mudança de temperatura ou pressão, a nova conformação (não nativa) pode adquirir mais preponderância para a formação de agregados irreversíveis. Embora estes últimos mecanismos tenham sido reportados na literatura, o mecanismo preferencial para a formação de agregados amilóides acontece por nucleação e por formação de *seeds* [31]. O monómero por si só não consegue formar agregados; o mecanismo geral de nucleação apresenta uma fase de *lag* (fase de nucleação) em que nenhum agregado é visível num determinado espaço de tempo, mas após

este período crítico aparecem vários agregados. Para iniciar o processo é necessário a formação de um núcleo ordenado formado por sobressaturação proteica que excede a concentração crítica, sendo que depois da sua formação, a fibrila cresce rapidamente, passando da fase *lag* para a fase do crescimento (Figura 3).



**Figura 3** - Formação cinética de uma fibrila amilóide. O crescimento da fibrila é descrito por uma curva sigmoide, que contempla uma etapa de nucleação, uma de crescimento, e o equilíbrio. Adaptado de [32].

A morfologia das fibrilas sofre alterações consoante as condições em que estão inseridas, sendo alguns dos fatores relevantes a concentração de proteína, o pH, a temperatura e a composição do meio. Apesar disto e tendo em conta o mecanismo que apresenta dois passos, nucleação e crescimento da fibrila, a temperatura não influencia da mesma forma cada passo [33].

A estrutura primária do péptido é também um fator a ter em conta na formação de fibrilas amilóides, tendo sido verificado que o início da agregação é desencadeado pelo péptido apresentar uma sequência propícia ao fenómeno [34], como o exemplo do efeito de aminoácidos hidrofóbicos na formação de fibrilas, que é reconhecido como tendo um papel essencial no processo. Pelo facto da exposição destes aminoácidos à água ser entropicamente desfavorável, há uma força de associação proteica que protege estas regiões hidrofóbicas de ambientes polares. Assim, estas regiões podem ser encontradas em estruturas globulares ou na superfície proteica para interações específicas [35]. Apesar de algumas proteínas globulares serem conhecidas como proteínas com capacidade de produção de fibrilas por apresentarem um núcleo hidrofóbico, isto não acontece para todas as proteínas. Assim sendo,



o facto dos aminoácidos hidrofóbicos serem expostos para ultrapassar interações desfavoráveis não é por si só o fator desencadeador do processo de agregação, pois existem proteínas com capacidade de originar fibrilas amilóides que não apresentam estrutura globular, nem uma sequência composta de uma percentagem considerável de aminoácidos com natureza hidrofóbica.

Para além da relevância dos aminoácidos hidrofóbicos, os aminoácidos aromáticos apresentam também um papel relevante na formação de fibrilas. Os aminoácidos aromáticos apresentam uma frequência muito pequena na ocorrência em proteínas, sendo de 3,2% para a tirosina, 3,9% para a fenilalanina e 1,3% para o triptofano; esta pequena frequência pode ser resultado de uma pressão seletiva que beneficia sequências proteicas que não são propensas a agregação [36]. Apesar disso, é verificado que pequenos fragmentos das sequências proteicas que apresentam as mesmas capacidades para formação de fibrilas que a sequência total, apresentam uma percentagem de ocorrência de aminoácidos aromáticos muito superior em comparação com a sequência total proteica. Os anéis aromáticos destes aminoácidos permitem interações não covalentes, por *stacking*  $\pi$ , que podem provocar uma contribuição energética e favorecem o processo de agregação. Existem também padrões nas estruturas amilóides, como o padrão de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos. Isto ocorre devido à possibilidade da folha- $\beta$  poder formar ao mesmo tempo ligações por pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas.

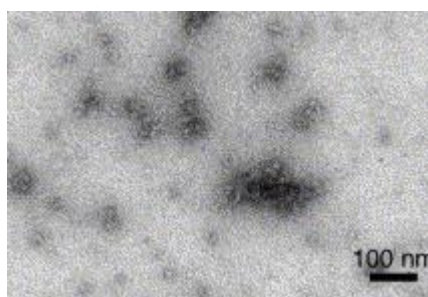
A solubilidade é também encontrada como um fator a ter em conta na formação de fibrilas amilóides, encontrando-se no entanto relacionada com outros fatores, como a sequência proteica, o pKa, a temperatura e a força iónica do meio [37]. A maioria das proteínas encontra-se no estado menos solúvel perto dos valores de pI, e é verificado que a formação de fibrilas é superior em valores de pH em que a solubilidade é mínima, embora a correlação entre a estabilidade conformacional e a dependência do pH na extensão das fibrilas formadas ainda não esteja totalmente definida.

Barbienie et al. (2001) verificou que oligopeptídeos de pequenas dimensões, 4-6 resíduos, podem formar agregados do tipo amilóide com as mesmas características de uma proteína com os seus resíduos totais [38]. Isto sugere que a formação de agregados é uma propriedade genérica de proteínas e que estes agregados são o resultado maioritário de propriedades físico-químicas intrínsecas do polipéptido principal e não das cadeias laterais dos aminoácidos. Apesar disso é possível verificar também que a conformação da proteína

no estado parcialmente enrolado pode ser constituída totalmente ou maioritariamente por  $\alpha$ -hélices e haver o processo de formação de agregados proteicos sob condições desnaturantes [39]. É proposto então que a conformação dos intermediários não é uma característica essencial para a formação de agregados amilóides, sendo que a presença de condições desnaturantes leva a uma estabilização da conformação nativa da proteína ao interferir com a topologia das interações não covalentes da conformação nativa da proteína, levando à formação de agregados amilóides [40].

### 1.1.2 Agregados amorfos

Os agregados amorfos provenientes de proteínas são encontrados, tal como os agregados fibrilares, em algumas patologias, tais como os agregados da proteína  $\alpha$ -cristalina que origina as cataratas [41]. No entanto, o estudo da formação de fibrilas amilóides encontra-se muito mais desenvolvido do que o da formação de agregados amorfos [42]. Estes agregados apresentam organização desordenada e uma morfologia pouco definida (Figura 4) e enquanto o modelo de formação cinética maioritariamente aceite para a formação de fibrilas é o dependente da nucleação, no caso da formação dos agregados amorfos a sua cinética encontra-se pouco estudada não se sabendo ainda se a sua formação é dependente da etapa de nucleação [42]. Apesar disto, os resultados sugeridos com a proteína  $\beta_2$ -microglobulina colocam a hipótese de existir uma alta barreira de energia livre na fase de nucleação associada à formação das estruturas fibrilares amilóides, enquanto que a agregação amorfa ocorre sem associação a nenhuma barreira de energia livre, sendo feita a analogia entre a cristalização no fenómeno de formação de fibrilas e a transição vítrea de substâncias no caso da formação de agregados amorfos.



**Figura 4** - Imagem de microscopia de transmissão de agregados desordenados de morfologia amorfa [29].

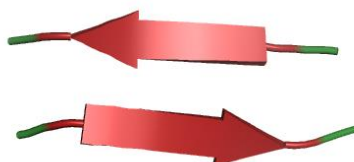
## 1.2 Beta amiloide

As patologias de Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II são algumas das patologias que estão associadas à deposição de fibrilas amilóides, sendo que cada uma destas patologias tem associada uma proteína específica envolvida na formação das fibrilas amilóides. Na doença de Alzheimer, o maior componente dos depósitos amilóides, o peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), tem tipicamente de 39 a 42 resíduos e forma preferencialmente estruturas ordenadas em forma de agregados que foram primeiramente purificados e sequenciados em placas amilóides, apresentando estrutura secundária com conformação em folha- $\beta$ , tendo o mesmo sido verificado por difração por Raio-X e por ensaios de fluorescência com *Congo red* [43] [44]. Apesar dos depósitos amilóides serem a estrutura final, são os oligômeros solúveis, intermediários do processo de fibrilação, na forma de dímeros, trímeros ou dodecameros, que são apontados como os responsáveis principais pela toxicidade e pelo surgimento da patologia [45], [46]. Este intermediário solúvel apresenta estrutura secundária maioritariamente em  $\alpha$ -hélice; no entanto, estas conformações dependem sempre do meio em que estão inseridos [47], [48]. São encontradas também no processo protofibrilas, precursores fibrilares, que apresentam maioritariamente estrutura secundária em folha- $\beta$  (estruturas comuns em processos de fibrilação amiloide) que se apresentam com estrutura fibrilar, mais flexível e de comprimento mais curto do que uma fibrila madura.

Já foram identificados os aminoácidos essenciais responsáveis para o processo de fibrilação do peptídeo beta amiloide, sendo estes os resíduos 16-20, que correspondem à sequência “KLVFF” [49]. Este núcleo central hidrofóbico “ $^{17}$ LVFF $^{20}$ ” é então essencial para a formação da fibrila. O fragmento do peptídeo  $A\beta$  que corresponde aos aminoácidos 16-22 contém este núcleo, sendo considerado a sequência mais pequena que forma fibrilas amilóides similares à proteína completa a pH neutro [50]. O processo de agregação foi estudado com esta sequência de aminoácidos por RMN em estado sólido, tendo sido verificado que há a formação de estruturas fibrilares ordenadas em incubação a pH 6,8 com folhas- $\beta$  antiparalelas.

Verificou-se que pequenos fragmentos das proteínas têm a capacidade de formar fibrilas *in vitro*, com as mesmas características das fibrilas resultantes da sequência total [51]. Por esta razão, sequências que integram os aminoácidos 16-20, tal como  $^{16}$ KLVFFA $^{21}$  (Figura 5), são utilizadas como modelo para estudar as interações primárias que levam à

formação de agregados, sendo encontrados estudos com os fragmentos  $^{16}\text{KLVFF}^{20}$  [52],  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  [53] e  $^{16}\text{KLVFFAE}^{22}$  [54]. Apesar das diferenças no tamanho da sequências, estes fragmentos exibem o mesmo comportamento que a proteína completa, nomeadamente na cinética de agregação e formação de oligómeros e fibrilas classificadas como *steric zippers*.



**Figura 5** - Representação do fragmento do peptídeo beta amilóide  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  obtida por recurso à estrutura em PDB “3OW9” pelo *PyMol*, com estruturas em *loop* identificadas com cor verde e folha- $\beta$  com cor vermelha.

### 1.3 Ovalbumina

A clara do ovo é composta por proteínas e glicoproteínas que totalizam 11% da sua composição [55]. Na sua constituição proteica, as proteínas maioritárias são a ovalbumina (54%), ovotransferina (12%), ovomucóide (11%), ovomucina (3,5%) e lisozima (3,4%), (Tabela 1) [56]. A clara de ovo é portanto uma fonte de proteínas para a dieta humana, com propriedades gelificantes e emulsificantes adicionais, sendo utilizada largamente na indústria alimentar [57]. Na sua constituição proteica são encontradas proteínas com propriedades biológicas importantes, como a lisozima, com aplicação na área da saúde e na preservação de alimentos, e a ovalbumina, que depois da sua clivagem forma peptídeos com atividade antimicrobiana [55], [58]. Muitas proteínas da clara do ovo são também utilizadas como modelos proteicos, tais como a ovalbumina, ovotransferina e a lisozima.

**Tabela 1** - Composição e características físico-químicas das proteínas maioritárias da clara do ovo [59], [60].

Proteína	% massa seca	pI	Temperatura desnaturação (°C)
Ovalbumina	54,0	4,1	84,0
Ovotransferina	12,0-14,0	6,1-6,6	57,0
Ovomucoide	11,0	3,9-4,3	ND
Ovomucina	3,5	4,5-5,0	ND
Lisozima	3,4-3,5	10,7	82,0
Ovoflavoproteína	0,8	4,0-4,1	69,0-72,0
Ovomacrogubina	0,5	4,5-4,7	69,0-72,0
Ovoinibidor	1,5	5,1-5,2	69,0-72,0
Ovogicoproteína	1,0	3,9	69,0-72,0
Avidina	0,5	9,5-10,0	ND

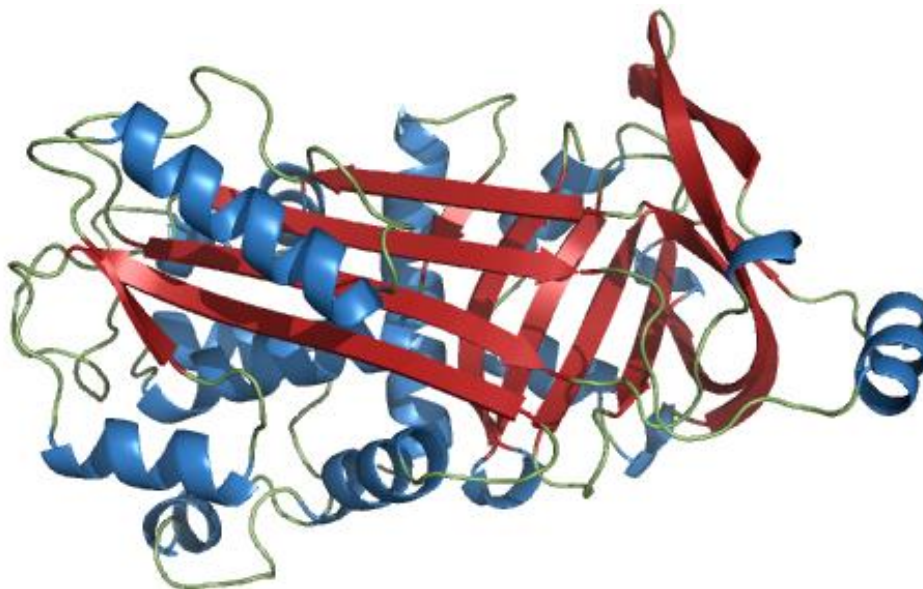
ND-não determinado

A ovalbumina, a proteína maioritária da clara do ovo, é uma fosfoglicoproteína solúvel em água e apresenta uma conformação globular, com a sua forma nativa constituída por 386 aminoácidos, com peso molecular de 45 kDa, e uma temperatura de desnaturação de 84 °C a pH neutro [61], [62]. Esta proteína é da família das Serpinas (serina inibidora de protéase), que tem mais de 300 proteínas homólogas com diversas funções encontradas em animais, plantas, insetos e vírus [63], embora não apresente atividade inibidora de protéases [62]. Para além da sua importância na aquisição de aminoácidos na dieta humana, esta proteína é regularmente usada como modelo proteico em estudos estruturais.

A ovalbumina contém seis resíduos de cisteína, sendo este um resíduo muito importante para a morfologia dos agregados formados a temperaturas elevadas, devido à formação de pontes de dissulfureto, sendo que dois destes resíduos estão envolvidos numa ponte de dissulfureto intramolecular essencial para a conformação proteica [62], [64]. Normalmente, são formadas longas fibrilas quando as pontes de dissulfureto reduzidas são aquecidas, embora no caso da ovalbumina se formem fibrilas semi-flexíveis [65].

A ovalbumina apresenta uma estrutura terciária semelhante à das proteínas da família das Serpinas tendo cerca de 35% de  $\alpha$ -hélice e 45% de folha- $\beta$  (Figura 6) [65], apresentando cinco cadeias em folha  $\beta$  que acompanham todo o eixo longitudinal da proteína, enquanto o

centro reativo apresenta uma conformação de  $\alpha$ -hélice. O mecanismo de desnaturação e enrolamento já foi caracterizado em detalhe [66].



**Figura 6** - Representação da estrutura terciária da ovalbumina obtida por recurso à estrutura em PDB “1OVA” pelo *PyMol*, com estruturas em *loop* identificadas com cor verde,  $\alpha$ -hélices com cor azul e folha- $\beta$  com cor vermelha.

No caso da agregação para esta proteína, existem evidências da formação de fibrilas do tipo amilóide com desnaturação por calor a pH neutro [67]. Esta proposta de agregação amilóide é baseada em resultados obtidos por estudos de fluorescência com a Tioflavina T (ThT), embora dependendo de parâmetros como pH, temperatura e força iônica, são também obtidos vários tipos de agregados, inclusive outros tipos de agregados fibrilares, mas não amilóides. A pH 2 depois da desnaturação a 90°C são formados vários tipos de fibrilas, um tipo com estrutura em folha- $\beta$ , considerada amilóide, e o segundo tipo com propriedades mais flexíveis, com estrutura secundária definida [68]. Assim, o primeiro tipo é mais rígido e semi-flexível apresentando características típicas de fibrila amilóide, enquanto que o segundo tipo é caracterizado por fibrilas finas e flexíveis que crescem até comprimentos da ordem de micrómetros. Para além disso foram também identificados vários fragmentos da sequência de ovalbumina, que apresentam também formação de fibrilas do tipo amilóide similar à sequência total, como os fragmentos  $^{38}\text{LAMVYL}^{43}$ ,  $^{172}\text{MVLVNAIVFK}^{181}$  e  $^{364}\text{FLFCIK}^{369}$ , podendo ser usados como modelos para o estudo do mecanismo de agregação desta proteína [65].

## 1.4 Líquidos iónicos

Os líquidos iónicos são sais com temperatura de fusão inferior a 100°C, muitas das vezes líquidos à temperatura ambiente [69]. Estes são considerados solventes adequados para diversas aplicações devido às suas características, como pelo facto de serem não inflamáveis, apresentarem volatilidade negligenciável, elevada estabilidade térmica e eletroquímica, entre outros [69], [70]. Sendo sais, os líquidos iónicos apresentam uma elevada diversidade estrutural por diferentes combinações de anião e catião [71], tendo vindo a ser designados por “*designer solvents*” [72]. As propriedades destes solventes conduziram ao seu estudo em várias aplicações, como em biossensores, estabilizadores de proteínas e na preservação de amostras biológicas [73].

É possível verificar na literatura que proteínas na presença de líquidos iónicos sofrem modificações, nomeadamente na sua estabilidade, conformação ou solubilidade, sendo variáveis com o tipo de líquido iónico [74]. Na presença de líquidos iónicos têm sido reportados fenómenos como o aumento do enrolamento e inibição da agregação [75], aumento de formação de moléculas intermediárias [76], aumento da agregação [77], e formação de diferentes tipos de agregados, como fibrilas amilóides [78].

No caso específico de agregação de proteínas na presença de líquidos já foram reportados vários exemplos, como o aumento da fibrilação amilóide com a lisozima em líquidos iónicos próticos [78], assim como a inibição da sua formação [79]. Também já se verificou o efeito de líquidos iónicos derivados do catião imidazólio no aumento da formação de fibrilas amilóides com a proteína  $\alpha$ -sinucleína [80], e ainda a formação de fibrilas em líquidos iónicos próticos para o fragmento 16-22 da proteína A $\beta$  [81]. No caso da proteína ovalbumina, não foi ainda reportado a formação de agregados para esta proteína em líquidos iónicos, apesar de existir para as proteínas totais da clara do ovo com o líquido iónico tosilato de colínio ([Cho][Tos]) [82].

Apesar de existirem atualmente várias investigações na área, ainda permanece a dificuldade de selecionar, sem necessidade de ensaios laboratoriais, um líquido iónico adequado para estabilizar/agregar uma proteína específica [83]. O comportamento das proteínas na presença de líquidos iónicos tende a seguir a série de Hofmeister, em que se classificam os iões como cosmotrópicos ou caotrópicos [84]. Assim, os iões cosmotrópicos, que apresentam normalmente carga elevada e tamanho reduzido, tendem a aumentar as

ligações por pontes de hidrogénio, aumentando assim a estabilidade da proteína; enquanto os caotrópicos, normalmente iões de carga reduzida e de grande tamanho, conduzem a uma destabilização da estrutura da proteína. Apesar disto, nem todos os sistemas com líquidos iónicos e proteínas seguem esta série, pois existem alguns estudos contraditórios [85].

A especificidade na interação dos iões com determinados tipos de aminoácidos constituintes das sequências proteicas também já foi alvo de estudo, e foi verificado que tanto o anião como o catião estabelecem preferencialmente interações fracas com os resíduos proteicos [86], sendo que o comportamento das proteínas na presença de líquidos iónicos depende também das propriedades intrínsecas da solução, como o pH [87]. É assim relevante perceber quais as características dos líquidos iónicos que inibem ou aumentam a produção de agregados proteicos, tendo já como ponto de referência o estudo do [Cho][Tos] nas proteínas totais da clara do ovo [82]. É também pertinente perceber se o mesmo comportamento se mantém para uma das proteínas da sua constituição, como a ovalbumina; por outro lado, a troca de anião pode também ter um impacto significativo na interação dos líquidos iónicos com proteínas, tornando-se pertinente perceber a interação de um anião, derivado de uma estrutura de aminoácido, como por exemplo a arginina, com os aminoácidos constituintes das sequências em estudo. Até ao momento não existe nenhuma publicação com a utilização e estudo da interação de líquidos iónicos derivados de aminoácidos com proteínas.

## **1.5 Simulações de dinâmica molecular**

Apesar de existirem diversas técnicas laboratoriais que permitem obter informações sobre agregados proteicos, desde a quantificação e determinação do seu tamanho por técnicas de microscopia, como a caracterização por métodos como FTIR, DC, espectroscopia de Raman e RMN [4], persistem ainda dificuldades na obtenção de resultados concordantes devido ao polimorfismo apresentado pelos agregados, e também pelas espécies intermediárias que aparecem numa fase inicial do processo, no qual é difícil obter informação por estes métodos. É possível assim utilizar métodos computacionais, como as simulações de dinâmica molecular, que permitem fornecer informações das estruturas numa escala de tempo não possível laboratorialmente, entre vários outros exemplos.



### 1.5.1 Proteínas

A dinâmica conformacional das proteínas está, de certa forma, codificada nas suas estruturas, embora também seja variável com o meio, e é normalmente um elemento crítico para a sua função. A compreensão de como as proteínas funcionam implica uma conexão entre a estrutura tridimensional da proteína, obtida por técnicas como cristalografia de Raio-X e RMN, e pela dinâmica, que é difícil de observar experimentalmente [88]. A primeira simulação de dinâmica molecular foi realizada em 1977 e consistiu na obtenção da trajetória de uma pequena proteína com 58 resíduos, BPTI, inibidor da tripsina pancreática bovina, em vácuo durante 9,2 ps por McCammon, Gelin e Karplus [89]. Neste trabalho, foi verificado que o comportamento da proteína podia ser comparado ao de um fluido, na medida em que diferentes regiões apresentavam diferentes graus de flexibilidade e o movimento é não-harmónico. Em 1981 foi realizada nova simulação com a mesma proteína, mas durante 100 ps, permitindo confirmar os dados anteriormente obtidos verificando-se, adicionalmente, que as proteínas apresentam grandes variações de movimento ao longo do tempo, sendo estas maiores que o tempo total de simulação, o que sugeriu a existência de limitações na duração do tempo de simulação [90]. Em 1988, passados onze anos da primeira simulação, foi realizada uma nova simulação da mesma proteína em água durante 210 ps [91]. Entretanto, o poder computacional aumentou consideravelmente, permitindo executar simulações de proteínas com tamanho superior e durante mais tempo. Melhorias significativas nas funções de potencial tornaram também as simulações muito mais rápidas e precisas [92].

Podem ser obtidas informações sobre a dinâmica básica de proteínas pela separação das mesmas em domínios e pela existência de diferentes estruturas por estados conformacionais, mas não é fácil obter estas informações por inspeção visual [88]. Neste contexto, simulações de mecânica e dinâmica molecular (MM e MD, respetivamente) podem disponibilizar o detalhe final relativo ao movimento atómico individual em função do tempo, fornecendo respostas específicas sobre propriedades do sistema mais facilmente que dados experimentais. Para proteínas pequenas ou domínios proteicos não é expectável observar grandes transições conformacionais, sendo que uma simulação com uma duração na ordem dos nanosegundos num ambiente solvatado (na presença de solvente ao contrário das simulações realizadas no vácuo), contabilizando todos os átomos e sem restrições a nível de interações eletrostáticas, pode resultar em desvios de apenas 1 Å em comparação com a

estrutura central da proteína [93]. Assim, as simulações são úteis quando são realizadas em conjunto com ensaios laboratoriais para que o método possa ser validado e também melhorado, mas também para confirmação e obtenção de dados não possíveis de obter laboratorialmente [94].

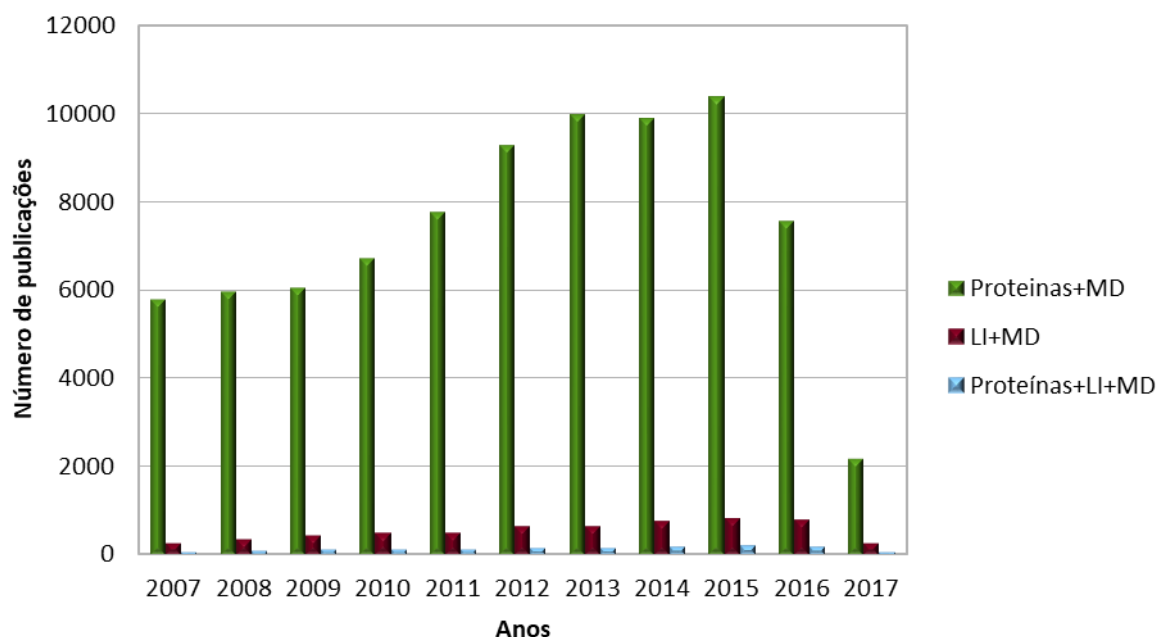
O primeiro estudo de agregação de proteínas usando simulações de dinâmica molecular com um modelo de solvente explícito, modelo que apresenta moléculas de água em que todos os átomos estão representados, foi publicado em 2003 [95], com o fragmento da proteína A $\beta$  16-22, tendo sido usada uma restrição harmónica para acelerar o processo de agregação. Posteriormente, foram reportados vários outros estudos com outras proteínas, mas sem a restrição associada [96], [97].

### 1.5.2 Líquidos iónicos

Na área das simulações de MD foram já realizados vários estudos com líquidos iónicos devido às inúmeras aplicações destes solventes [98], tendo a maioria destes sido realizada com o catião imidazólio [99], [100]. Estas simulações permitem fornecer uma visão da estrutura e dinâmica dos líquidos iónicos, pois um *design* adequado de líquidos iónicos requer a compreensão da sua natureza e das suas interações [98]. As simulações de dinâmica molecular podem ser assim uma poderosa ferramenta para inferir estruturas, dinâmicas e propriedades termodinâmicas destes solventes. A primeira simulação de dinâmica molecular de líquidos iónicos realizou-se em 2001, no centro de simulação atómica da universidade de Belfast, com o uso da forma cristalina de [C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim]Cl, cloreto de 1,2,3-trimetilimidazólio, [C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim][PF<sub>6</sub>], hexafluorofosfato de 1,2,3-trimetilimidazólio, [C<sub>2</sub>mim]Cl, cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio e [C<sub>2</sub>mim][PF<sub>6</sub>], hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazólio, e com o estado líquido de [C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim]Cl e [C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>mim][PF<sub>6</sub>] [101]. As propriedades calculadas foram volumes molares, energias médias e desvios quadrados médios das posições em função do tempo. Contudo, pode-se verificar que apesar das elevadas temperaturas usadas, o tempo de simulação (100 ps) pode não ter sido suficiente para obter dados de difusão adequados a partir dos desvios quadráticos de posição. No ano seguinte, foi desenvolvido um estudo da interação do líquido iónico [C<sub>1</sub>mim]Cl, cloreto de 1,3-dimetilimidazólio, com água, metanol e propano [102]. Com este estudo foi possível verificar que os grupos hidroxilo do soluto interagem principalmente com o anião do líquido

iônico, e que cada molécula de água associa-se a dois íons cloreto via ligação por pontes de hidrogênio, enquanto que o éter e o alceno não se associam tão fortemente ao ânion e os cátions mantêm uma conformação ordenada difusa em redor de todos os solutos. O mesmo grupo de investigadores avaliou também os potenciais químicos dos solutos já referidos na presença dos líquidos iônicos, usando integração termodinâmica [103]. Este estudo foi o primeiro exemplo de um cálculo de energia livre com um sistema contendo um líquido iônico e confirmou a importância das ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas na solvatação de líquidos iônicos. Nos anos seguintes foram realizados estudos sucessivos com diferentes líquidos iônicos [104].

Com o aumento do interesse tanto na área dos líquidos iônicos, como na continuação de estudos de dinâmica de proteínas, é possível utilizar bases de dados de citações de jornais e revistas científicas, sendo um destes o *Scopus* [105], para pesquisa do número de artigos disponíveis sobre o tema. Assim, como ilustra a Figura 7, é visível que nos últimos 10 anos há um aumento no número de publicações em todas as áreas pesquisadas, “*Proteins and molecular dynamics*”, “*Ionic liquids and molecular dynamics*” e “*Proteins and ionic liquids and molecular dynamics*”, sendo que a pesquisa de artigos de simulações de dinâmica molecular com proteínas é a que verifica o maior número de publicações, em que o número de publicações diminuiu mais de 6 vezes por comparação com dinâmica molecular e líquidos iônicos. Isto revela que as simulações de dinâmica molecular com proteínas, apesar do número elevado comparativamente com as outras duas pesquisas, ainda se encontra em fase de desenvolvimento. No caso do conjunto de dinâmica molecular com líquidos iônicos, e apesar de se verificar um aumento nos últimos dez anos decorrente do interesse crescente neste tipo de solventes, o número de publicações ainda se encontra inferior ao anterior, sendo ainda mais notório o número de publicações reduzidas com simulações de dinâmica molecular, proteínas e LIs, permitindo verificar a atualidade das investigações que conjugam estes três elementos.



**Figura 7** - Número de publicações existentes no *Scopus* encontradas por pesquisa usando as palavras chave “*Proteins and molecular dynamics*”, “*Ionic liquids and molecular dynamics*” e “*Proteins and ionic liquids and molecular dynamics*” nos últimos 10 anos; dados obtidos no dia 12 de Junho de 2017.

### 1.5.3 Métodos de simulação de dinâmica molecular

Existem duas famílias principais de métodos de simulação de dinâmica molecular que diferem no modelo físico para a representação do sistema [106]. O termo mecânica molecular (MM) é utilizado para descrever a aplicação da mecânica clássica, com recurso às equações de movimento de Newton, para a determinação da energia e dinâmica de sistemas moleculares em que os graus de liberdade eletrônicos são removidos [107]. Em oposição, o modelo de mecânica quântica (QM) considera explicitamente graus de liberdade eletrônicos e descreve explicitamente a natureza da ligação química, sendo a energia e dinâmica do sistema regidos pela equação de Schrödinger [108].

Em mecânica molecular, os efeitos quânticos são ignorados, apesar de permitirem uma descrição mais detalhada e precisa do sistema a ser simulado [109]. Isto é explicado devido ao número de graus de liberdade introduzido pela inclusão de elétrons, que não é computacionalmente comportável na simulação de sistemas de tamanho considerável. São realizadas, por isso, aproximações em que os graus de liberdade considerados são restringidos às posições do centro de massa dos átomos ou restritos pela utilização de grupos

de átomos em vez de todos os átomos individualmente (modelo “*united-atoms*”), embora este processo adicione algumas limitações. Nestas restrições, cada partícula (átomo ou conjunto de átomos) é considerado como um centro de massa, sendo esta abordagem justificada pela aproximação *Born-Oppenheimer* em que apenas os deslocamentos nucleares podem ser considerados. O método de MM é eficiente para simular a maioria dos sistemas, mas na existência de átomos leves ou sistemas a temperaturas elevadas, devem ser considerados os efeitos quânticos [110]. Por isso, com a utilização de MM, é necessário utilizar os potenciais intermoleculares com as correções necessárias ou, em alternativa, tratar ligações interatômicas como restrições nas equações de potencial e/ou movimento. Assim, o modelo escolhido para a simulação deve estar em conformidade com a propriedade ou quantidade de interesse.

As simulações computacionais são uma forma de obter dados de uma experiência impossível, com risco no processo, de alto custo ou de propriedades não observáveis em contexto laboratorial [110], [111]. Também pela complexidade dos sistemas biológicos, as simulações computacionais são importantes para estudar propriedades termodinâmicas e processos cinéticos, o que permite entender aspetos dinâmicos de biomoléculas [108], [112]. Para além disso, é possível também refinar estruturas determinadas por técnicas como RMN e Raio-X. As aproximações de MM são aplicadas em diversas simulações como dinâmica molecular (MD) e Monte Carlo (MC) [108]. As simulações MC requerem menor tempo de computação para cada interação do sistema em comparação com as de MD pois não requerem o cálculo das forças exercidas nas partículas que compõem o sistema, mas não apresentam o mesmo rendimento para propriedades dependentes do tempo, como coeficiente de difusão [113].

#### **1.5.4 Etapas da simulação MD**

O processo de simulação, com a utilização de dinâmica molecular, começa pela preparação de um modelo computacional do sistema molecular, normalmente com recurso a dados de RMN ou cristalografia [114], em que é explícita a topologia das moléculas (átomos a conectividades) e a posição inicial de cada partícula que compõe o sistema [115], [116]. Seguidamente, é escolhido o campo de forças com a parametrização adequada ao sistema, de forma a reproduzir o movimento real das moléculas e energias associadas [107].

Este conjunto de parâmetros é definido como campo de forças, pois representa as contribuições das várias forças atômicas que dominam a dinâmica molecular. Vários campos de forças são comumente usados neste tipo de simulações computacionais, como AMBER, CHARMM e GROMOS, que diferem no tipo de parametrização [117].

São normalmente aplicadas algumas restrições ao sistema na parametrização, dado que os movimentos encontrados no sistema não apresentam todos a mesma escala temporal (por exemplo os movimentos vibracionais são muito mais rápidos que os translacionais) [118]. Se não existissem essas restrições, o passo de integração teria que ser diminuído, tendo como consequência o aumento do tempo de cálculo computacional. No entanto é possível subtrair estes movimentos mais rápidos do cálculo das interações, diminuindo os graus de liberdade dos movimentos com maior frequência, o que leva ao aumento do passo de integração das equações de movimento e reduz o custo computacional [119]. Existem ainda outras variáveis nas simulações de dinâmica molecular que precisam de ser controladas por algoritmos adequados conforme os objetivos, como a temperatura e pressão.

Para a otimização da geometria do sistema (determinação da configuração molecular que minimiza a energia total do sistema) são executados passos de minimização de energia, em que são procurados estados com menor energia associada, ou seja, conjuntos de coordenadas com mínimos de energia potencial locais, podendo este processo ser realizado por diferentes algoritmos [120]. O algoritmo tem a função de relaxar distorções nas ligações, ângulos e interações de *van der Waals* e de Coulomb através de ajustes nas posições atômicas. Alguns dos algoritmos mais utilizados são o *steepest descent* [121], e o método dos gradientes conjugados [122].

A simulação de MD propriamente dita começa pela equilibração do sistema, pois as coordenadas iniciais são muito diferentes das encontradas no equilíbrio termodinâmico [123]. Nesta fase, as propriedades termodinâmicas não são mantidas constantes, ao contrário do passo de minimização, e a sua duração depende do tamanho e complexidade do sistema em causa [124]. As forças que atuam nos átomos do sistema são calculadas e as posições dos átomos modificam-se segundo as leis de Newton. Assim, o conjunto de propriedades do sistema que são mantidas constantes durante a integração das equações de Newton são denominadas de *ensemble*. Existem diversas alternativas para o *ensemble* sendo que é possível usar a forma *NVT* em que é usado o número de partículas, volume e temperatura constantes, e *NpT* em que é usado o número de partículas, pressão e temperaturas constantes

[125]. A fase de equilibração encontra-se concluída quando o sistema alcança o equilíbrio termodinâmico. A fase seguinte consiste na produção da simulação de forma a obter as trajetórias e propriedades do sistema. A trajetória de cada partícula é o conjunto de posições e velocidades ao longo do tempo e pode ser obtida pela utilização das equações de movimento.

As equações de movimento de Newton providenciam uma relação entre a força e a alteração das posições dos átomos [126]. A integração destas equações é feita por um método numérico e este terá uma grande influência na estabilidade do sistema e na eficiência das simulações [120], [126]. A solução da equação de movimento de Newton (equação 1) permite que a simulação de dinâmica molecular seja efetuada, sendo  $\mathbf{F}_i$  a força que atua na partícula,  $m_i$  a massa do átomo e  $\mathbf{a}_i$  a aceleração deste.

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i \quad (1)$$

As forças que atuam na partícula  $i$  podem ser determinadas pela primeira derivada da equação de energia potencial do sistema obtida pelo campo de forças escolhido, em ordem à posição da partícula ( $r_i$ ) (equação 2):

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V(r)}{\partial r_i} \quad (2)$$

Esta equação permite calcular diretamente a aceleração da partícula. Como ponto de partida, esta pode ser usada para obter as velocidades, integrando as equações de movimento, em que por sua vez a integral da velocidade irá proporcionar a mudança de posição do átomo. Com as novas posições e velocidades de cada partícula são obtidas as energias de potencial e cinética do sistema, respetivamente. A integração destas equações de movimento é realizada através da utilização de algoritmos baseados em métodos de diferenças finitas, em que a integração é realizada em pequenos passos de tempo (passos de integração)  $\Delta t$  [127]. Um dos algoritmos mais utilizados para este processo é o de Verlet, obtido pela utilização da expansão em série de Taylor, que com a posição e aceleração dos átomos no tempo  $t$  e as posições no tempo  $t$  anterior, permite determinar as novas posições no tempo  $t + \Delta t$  pela equação 3:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t)\Delta t^2 \quad (3)$$

### 1.5.5 Campo de forças

Ao longo dos anos têm vindo a ser desenvolvidos vários campos de forças para biomoléculas [128]. De forma mais ou menos geral, as forças que atuam no sistema podem ser divididas em forças em que existe ligação covalente entre átomos (interações *bonded*) e em que não existe ligação covalente (interações *nonbonded*). As interações *bonded* são, genericamente, modeladas usando funções harmónicas e/ou sinusoidais [129]. No caso do campo de forças GROMOS, AMBER e OPLS, as interações *nonbonded* tratam-se de interações de *van der Waals*, que são modeladas com o potencial *Lennard-Jones*, e interações eletrostáticas modeladas com recurso à lei de *Coulomb*. Nos campos de força mais usados, como sejam o AMBER e OPLS, o potencial associado a ligações covalentes entre átomos diretamente ligados é calculada pela equação 4.

$$V_{\text{ligações}} = \sum K_l (l - l_{eq}) \quad (4)$$

Neste caso,  $l$ , representa a distância entre os átomos  $i$  e  $j$  (Figura 8), sendo  $l_{eq}$ , o seu valor de equilíbrio e  $K_l$  a constante de força. A distensão das ligações é descrita como um potencial harmónico de acordo com a lei de *Hooke*.



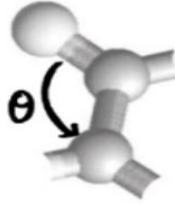
**Figura 8** - Distensão das ligações químicas, representado por  $l$ . Adaptado de [130].

$V^{\text{ângulos}}$  descreve a energia potencial dos ângulos formados e tal como para as ligações tem em conta a soma de todos os ângulos  $\theta$ , dependendo de uma constante de força  $K_\theta$  e  $\theta_{eq}$ , o ângulo de equilíbrio (equação 5).

$$V^{\text{ângulos}} = \sum K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad (5)$$



Tal como no cálculo das distensões das ligações, a flexão dos ângulos entre três átomos ligados,  $i$ ,  $j$  e  $k$  (Figura 9), é descrita como um potencial de acordo com a lei de *Hooke*.

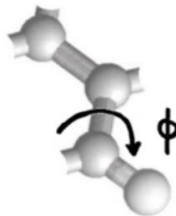


**Figura 9** - Flexão de ângulos entre três átomos ligados. Adaptado de [130].

$V^{\text{torção}}$  descreve a energia potencial total das interações de diedros e é calculada pela soma de ângulos diedros  $N_\phi$ , com recurso à equação 6:

$$V^{\text{torção}} = \sum \frac{1}{2} V_n ([1 + \cos[n\phi - \delta]]) \quad (6)$$

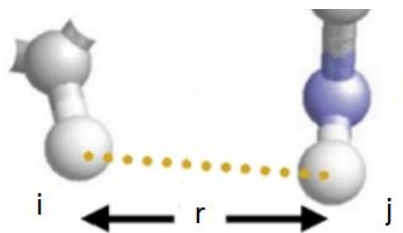
Em que  $V_n$  é o valor máximo de desfaseamento que pode ser alcançado, sendo  $n\phi$  o potencial periódico de periodicidade (Figura 10) e  $\delta$  o desfaseamento.



**Figura 10** - Representação da torção periódica de uma ligação. Adaptado de [130].

No caso das interações *van der Waals*, estas são calculadas a partir do potencial *Lennard-Jones*, que é caracterizado pelos parâmetros  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$ , que relativamente a dois átomos, contém um termo atrativo que varia com  $rij^{-6}$  e um termo repulsivo que varia com  $rij^{-12}$ , sendo que  $rij$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$  (Figura 11), pela equação 7:

$$V^{LJ} = \sum \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (7)$$

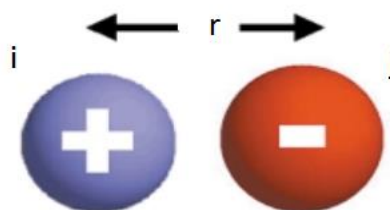


**Figura 11** - Representação da interação de *van der Waals*. Adaptado de [130]

No caso das interações eletrostáticas, estas aplicam-se entre pares de átomos que interagem, usando a interação de Coulomb,  $V^C$  (equação 8), com os parâmetros  $q_i$  e  $q_j$ , cargas parciais, e  $r$ , distância entre partículas (Figura 12).

$$V^C = \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \frac{1}{r_{i,j}} \quad (8)$$

Em que  $\epsilon_0$  é a permissividade dielétrica do vácuo, enquanto que  $\epsilon_1$  é a permissividade relativa do meio em que os átomos estão inseridos, sendo normalmente 1.



**Figura 12** - Representação da interação de Coulomb. Adaptado de [130].

## 1.5.6 Algoritmos

### 1.5.6.1 Temperatura e pressão constante

No início de uma simulação a temperatura é definida pela velocidade atribuída aos átomos. No entanto, durante a simulação a temperatura varia devido à conversão entre energia potencial e cinética [109]. É necessário obter também as coordenadas e velocidades iniciais de todos os átomos do sistema, sendo que as velocidades são normalmente geradas aleatoriamente pelo *software* da simulação, partindo da distribuição de Maxwell-Boltzmann [131]. Assim, para o controlo da temperatura pode ser utilizado um termóstato como o de

Berendsen que mantém a temperatura, acoplando o sistema a um banho térmico com uma temperatura fixa, em que durante a simulação as velocidades são atualizadas repetidamente a cada passo de integração, para que a energia cinética do sistema se aproxime da temperatura desejada [132].

O cálculo da energia cinética total do sistema é dado pela equação 9:

$$E_{cinética}(t) = \sum \frac{1}{2} m_i v_i^2(t) = \frac{1}{2} N_{df} k_b T(t) \quad (9)$$

em que  $N_{df}$  é o número de graus de liberdade no sistema e  $k_b$  é a constante de Boltzmann.

A temperatura instantânea  $T$  do sistema que é obtida em cada passo de integração das equações de Newton é então forçada a variar até à temperatura  $T_0$ . Esta tendência é seguida pela equação 10:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (10)$$

em que o  $T_0$  é a temperatura do banho,  $T$  a temperatura do sistema e  $\tau$  uma constante de tempo que faz com que o desvio da temperatura instantânea e do banho decaia exponencialmente no tempo [133]. O fator de escalonamento das velocidades  $\lambda$  a aplicar a cada  $\Delta t$  (passo de integração) relaciona-se com a constante de acoplamento pela equação 11.

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left( \frac{T_0}{T} - 1 \right) \quad (11)$$

No caso da pressão esta também é controlada por baróstatos como Berendsen [132] ou Parrinello-Rahman [134]. No caso do método de Berendsen a pressão é mantida constante pela alteração do volume do sistema, sendo as posições dos átomos corrigidos por um fator, dado pela equação 12:

$$\chi^3 = 1 - (\beta_T) \frac{\Delta t}{\tau_p} (P_0 - P) \quad (12)$$

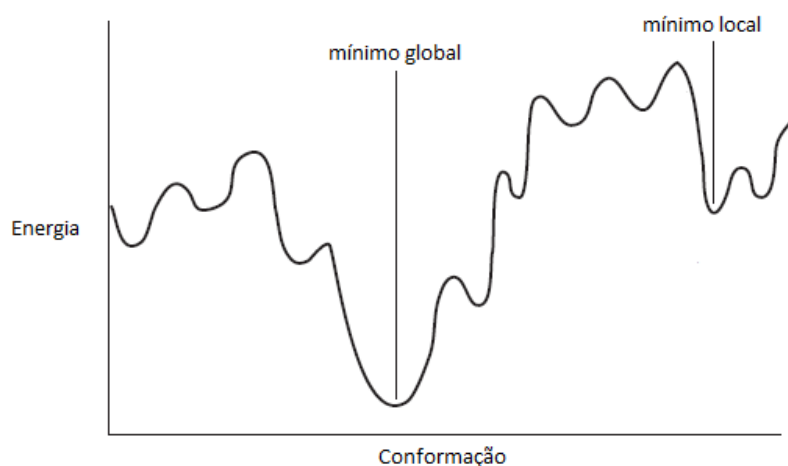
Assim, o valor da pressão  $P$  do sistema irá tender para um valor  $P_0$ , tal como o que

acontece com o uso do mesmo algoritmo na temperatura, pela equação 13:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{(P_0 - P)}{\tau} \quad (13)$$

### 1.5.6.2 Minimização de energia/Otimização de estruturas

A minimização de energia total de um sistema permite otimizar a sua estrutura procurando uma conformação num estado de energia mínimo, podendo este ser um mínimo local ou global (Figura 13), e em que as forças que nele atuam são tendencialmente nulas [110].



**Figura 13** - Representação da energia de cada conformação possível para uma molécula. Adaptado de [110].

O algoritmo de *steepest descent* utiliza a primeira derivada da energia potencial para limitar a direção para o mínimo de energia, sendo um método rápido e robusto mas apenas adequado para as primeiras minimizações [126]. Este método diminui a sua taxa de convergência com a aproximação do mínimo e avança para este cada vez a menor velocidade. As posições das partículas são dadas pela equação 14:

$$r_{n+1} = r_n + \frac{F_n}{\max(|F_n|)} h_n \quad (14)$$

Sendo que  $r$  é um vetor posição do átomo e  $\mathbf{F}$  as forças nele aplicado. O algoritmo acaba o processo quando chega ao limite de passos pré-estabelecidos pelo utilizador ou quando a diferença de energias entre passos consecutivos é inferior a um valor pré-definido. Por outro lado, tem-se também o algoritmo de gradiente conjugado, que se comporta como o método anterior quando se encontra longe do mínimo, embora quando se encontre perto, este realize uma mudança de direção através do gradiente, o que o leva a encontrar o mínimo de energia de uma forma mais rápida e eficiente do que o algoritmo anterior [120].

### 1.5.7 Caixa de simulação e condições de simulação

O sistema produzido pela simulação é limitado por uma caixa de simulação, devido à impossibilidade de simular o sistema macroscópico completo. A caixa contém a molécula de interesse em vácuo ou pode também incorporar moléculas de solvente [120], [135]. São utilizados diferentes tipos de geometria, podendo a caixa de simulação ser cúbica, dodecaédrica ou paralelepípedica. A quantidade de átomos presentes no sistema é significativamente menor (na ordem dos  $10^2$  aos  $10^6$ ) do que o número de Avogadro; por isso, as condições de superfície na fronteira têm muita influência no resultado dado que o número de partículas do sistema é muito menor do que o sistema macroscópico. Para reduzir estes efeitos são usadas condições periódicas de fronteira. Estas condições implicam que o sistema produzido esteja rodeado por todos os lados, de cópias exatas dele mesmo, levando a que se uma partícula do sistema sair da caixa de simulação, então uma das suas imagens estará a entrar na caixa, mantendo o número de partículas conservado dentro da caixa de simulação (de forma análoga ao conceito de célula unitária em cristalografia). O *cut-off* escolhido para as interações de longo alcance permite seleccionar se a partícula conseguirá ver, ou não, a sua imagem no sistema. Contudo, a exclusão da computação de interações entre partículas que distam mais que o *cut-off* leva a que seja necessário introduzir mecanismos de cálculo da compensação electrostática devido a todas as células adjacentes. Esta compensação é normalmente calculada usando métodos baseados na soma de Ewald, tais como PME (*Particle Mesh Ewald*) [136].

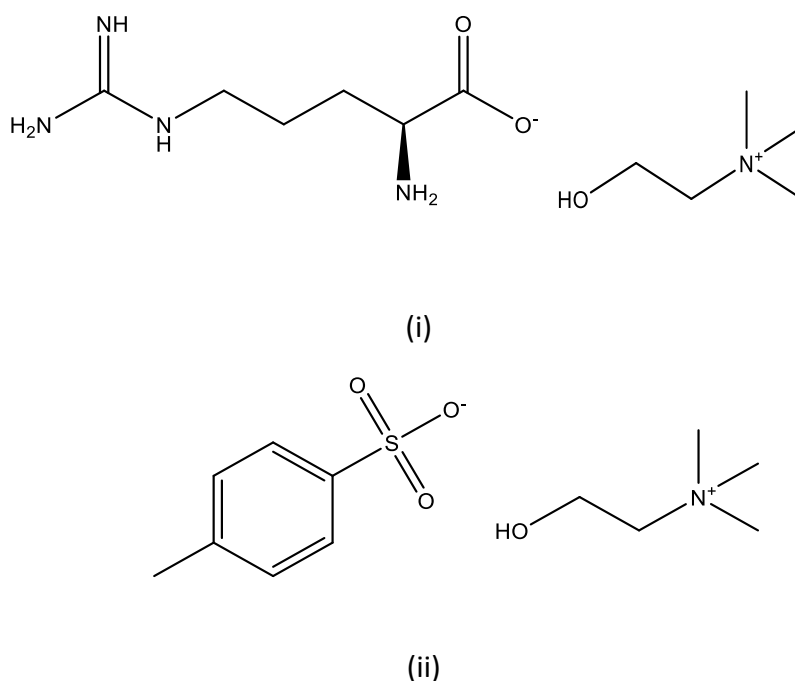
## 1.6 Objetivo da dissertação

Ao avaliar os estudos já efetuados e encontrados na literatura sobre o mecanismo de formação de agregados proteicos e os fatores que interferem neste processo, é possível concluir que é um tema que ainda se encontra distante de estar bem compreendido. A compreensão dos mecanismos subjacentes à formação de fibrilas amilóides e agregados amorfos é por isso de extrema relevância, no sentido de encontrar soluções para controlar ou inibir a sua formação conforme o interesse de aplicação ou área em estudo. Para este entendimento, a utilização de proteínas e fragmentos modelo, que apresentam comportamento e propriedades bem conhecidas, permite racionalizar os fatores que influenciam o mecanismo de agregação. Neste contexto, foi feito um estudo sistemático laboratorial com as proteínas totais da clara do ovo, com uma das proteínas suas constituintes - ovalbumina, e com um fragmento do peptídeo beta amilóide -  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , manipulando o processo de agregação pela utilização de dois líquidos iônicos, nomeadamente o arginato de colínio e tosilato de colínio, a diferentes concentrações e com meios a diferente pH. Com o objetivo de estudar a estabilidade dos agregados formados, utilizaram-se simulações de dinâmica molecular, com campos de força atomísticos, para os três fragmentos proteicos, o mesmo fragmento da proteína A $\beta$  já referido e dois fragmentos da proteína ovalbumina, em sistemas com água e os mesmos líquidos iônicos. Estes estudos permitiram descrever o comportamento dos agregados proteicos formados e também a sua estabilidade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Metodologia laboratorial

Para este trabalho foi utilizado o fragmento 16-21 do peptídeo beta amiloide, a proteína ovalbumina da clara de ovo, e as proteínas totais da clara do ovo. O fragmento da proteína A $\beta$  foi fornecido pela Tebu-Bio (pureza superior a 98,5%), a proteína ovalbumina foi adquirida através da Acros Organics, enquanto que a solução de clara de ovo foi preparada no laboratório com recurso a ovos de supermercado. Foram utilizados dois líquidos iônicos, arginato de colínio e tosilato de colínio, que foram sintetizados no laboratório, tendo sido comprovada a sua pureza por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , estando as respetivas estruturas representadas na Figura 14.



**Figura 14** - Estruturas químicas dos líquidos iônicos: (i) arginato de colínio [Cho][Arg]; (ii) tosilato de colínio, [Cho][Tos].

## **2.1.1 Síntese de líquidos iônicos**

### **2.1.1.1 [Cho][Arg]**

Para a síntese do líquido iônico arginato de colínio, a solução de bicarbonato de colina aquosa (solução com pureza 80% obtida pela Proionic) foi adicionada a L-arginina (pureza superior a 98% obtida pela Acros Organics), numa relação molar de 1:1, sob agitação à temperatura ambiente durante 24h. O líquido iônico foi lavado com acetonitrilo (70% (v/v)) e metanol (30% (v/v)) (ambos com pureza de 99%, obtidos pela Fisher Scientific) para remover os compostos que não reagiram, e os restantes solventes foram removidos sob pressão reduzida utilizando o evaporador rotativo a 60°C durante 2h. O líquido iônico formado foi finalmente seco/purificado numa linha de vácuo durante 3 dias a 57°C, cuja estrutura química foi verificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### **2.1.1.2 [Cho][Tos]**

A síntese do líquido iônico tosilato de colínio ([Cho][Tos]) baseou-se no protocolo descrito em [137], por reação ácido-base entre o bicarbonato de colina (pureza superior a 80%, obtida pela Proionic) e o ácido mono-hidratado p-Toluenossulfônico (Alfa Aesar), na proporção 1:1, sob agitação durante 24h. Foi obtido um líquido transparente que indica o final da reação, e os resíduos da reação foram removidos por três lavagens com acetato de etilo (com pureza de 99%, obtido pela Carlo Erba), tendo sido descartados junto com o acetato de etilo. Os solventes voláteis foram eliminados por evaporação usando o evaporador rotativo durante 1h a 60°C. O líquido iônico foi seco sob vácuo, tal como descrito anteriormente, tendo sido obtido um composto sólido de cor branca que foi armazenado à temperatura de 5°C, e cuja estrutura química foi verificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



### **2.1.2 Preparação das soluções com o fragmento do peptídeo beta amiloide e líquidos iónicos**

Para o estudo da agregação do fragmento do peptídeo beta amiloide foram preparadas duas soluções *stock* a pH 2 e 7. Foram utilizadas como soluções *stock* soluções de 2% (*m/m*) do fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  da proteína A $\beta$ ; a solução a pH 2 foi preparada pela adição de  $25,00 \pm 0,05$  mg de péptideo puro a  $1250,00 \pm 0,05$  mg de água Milli-Q com pH previamente ajustado a 2 com ácido clorídrico 37%, obtido pela AnalaR Normapur. O pH foi controlado com um medidor de pH Metrohm 827 pH lab. A solução a pH 7 foi preparada por adição de  $25,00 \pm 0,05$  mg de péptideo puro a  $1250,00 \pm 0,05$  mg de PBS (tampão fosfato salino a pH 7,3, obtido pela Acros Organic). Estas soluções foram utilizadas para fazer o estudo com os vários líquidos iónicos, [Cho][Arg] e [Cho][Tos], nas concentrações de 0,05 e 0,5 M, em que para obter as concentrações desejadas foram adicionadas ao sistema as massas apresentadas em Anexo A, Tabela A.1.

### **2.1.3 Preparação das soluções com a proteína ovalbumina e líquidos iónicos**

Para o estudo de agregação da ovalbumina foram preparadas duas soluções a pH 2 e 7. No caso do estudo a pH 2, foi utilizada como solução *stock* uma solução de 2% (*m/m*) de ovalbumina, preparada pela dissolução de ovalbumina em água Milli-Q previamente acertada a pH 2, com ácido clorídrico 37% (obtido pela AnalaR Normapur). O controlo de pH foi realizado com um medidor de pH Metrohm 827 pH lab. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação durante 2 min a 10000 rpm, e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a 5°C. No caso da solução a pH 7, efectuou-se o mesmo procedimento, tendo sido usada uma solução *stock* de 2% (*m/m*) de ovalbumina, preparada pela adição de ovalbumina em. Estas soluções de proteína foram utilizadas para preparar as soluções com os líquidos iónicos [Cho][Arg] e [Cho][Tos], nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M, em que para obter estas concentrações foram adicionadas ao sistema as massas apresentadas em Anexo A, Tabela A.2. Tendo sido realizadas quatro réplicas independentes no estudo a pH 2 inicial e duas réplicas a pH 7 inicial.

#### **2.1.4 Preparação das soluções com as proteínas totais da clara de ovo com líquidos iônicos**

A solução de clara de ovo foi preparada pela simples quebra do ovo e da perfuração da membrana com a separação da gema da clara. A clara de ovo foi agitada durante 10 min para uma homogeneização completa, e seguidamente foi diluída com água Milli-Q previamente ajustada a pH 2, com ácido clorídrico 37%, obtido pela AnalaR Normapur, sofrendo novo passo de agitação por 10 min, para obtenção da solução *stock* a 2% (*m/m*). Posteriormente, esta solução filtrada duas vezes com papel de filtro, com tamanho de poro 2,5  $\mu\text{m}$ , obtido pela Prat Dumas France, para a remoção de impurezas insolúveis. Foi obtida uma solução turva com pH aproximado de 8,6, que foi ajustado para pH 2 pela adição, gota a gota, de uma solução de ácido clorídrico em água Milli-Q. Esta solução foi usada para fazer o estudo com o líquido iônico [Cho][Arg], nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M, em que para obter estas concentrações foram adicionadas ao sistema as massas apresentadas em Anexo A, Tabela A.3, tendo sido realizadas quatro réplicas independentes.

#### **2.1.5 Microscopia**

O estudo de microscopia foi realizado com um microscópio de luz polarizada Olympus BX51 (Olympus Co., Tokyo, Japan).

#### **2.1.6 Ensaio de Fluorescência com Tioflavina T (ThT)**

Para o ensaio de fluorescência usando Tioflavina T (ThT), foi preparada uma solução *stock* de ThT de concentração 2,5 mM. Para a sua preparação, foram adicionadas  $79,70 \pm 0,05$  mg de ThT (2,5 mM), obtida pela Acros organics, a um tampão de fosfato de sódio (10mM) e cloreto de sódio (150mM) obtido pela LabKem, com pH 7,0; seguidamente, a solução foi filtrada com papel de filtro com poros de 2,5  $\mu\text{m}$ , obtidos pela Prat Dumas France. Esta solução foi mantida a 5°C e no escuro. Da solução *stock* de ThT foi preparada a solução para o ensaio com a concentração de 10 $\mu\text{M}$  de ThT por diluição de 0,40 mL da solução *stock* em 100 mL do tampão de fosfato de sódio (10 mM) e cloreto de sódio (150mM) a pH 7,

previamente usado, sendo que a solução preparada tem apenas a viabilidade de 48h, tendo sido mantida no escuro e a 5°C.

O ensaio foi realizado por adição de 0,2 mL das soluções de ovalbumina e proteínas totais da clara de ovo com as diferentes concentrações de líquidos iônicos e água a pH 2, em 1,8 mL da solução de ThT 10 µM. Foram utilizadas células de quartzo (Hellma Analytics) e um espectralfluorímetro FP-8300 Jasco. O comprimento de onda de excitação foi de 440 nm, e foram obtidos gráficos de emissão entre os 450 e os 550 nm, com 0,5 nm de intervalo.

## 2.2 Metodologia Computacional

### 2.2.1 Algoritmo PASTA 2.0

Foi realizada uma previsão dos fragmentos da sequência da proteína ovalbumina que apresentam mais propensão para a agregação na forma de fibrilas amilóides com recurso ao algoritmo PASTA 2.0, *prediction of amyloid structural aggregation* [138]. Foi utilizado este algoritmo para comparação dos resultados de 9 fragmentos da sequência da proteína ovalbumina, que contêm entre 8 a 19 resíduos, tendo estas sido escolhidas diretamente da sequência completa da ovalbumina do organismo *gallus gallus* (código Uniprot P01012), que apresentam alta e baixa percentagem de aminoácidos hidrofóbicos (entre 0,250 e 0,875 %) para verificar a sua influência na energia prevista para a fibrilação. Os fragmentos da ovalbumina escolhidos foram: <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup>, <sup>173</sup>MVLVNAIVFKG<sup>183</sup>, <sup>195</sup>QAMPFRVT<sup>202</sup>, <sup>204</sup>ESKPVQMMYQIGLFRVASM<sup>224</sup>, <sup>227</sup>KMKILELP<sup>234</sup>, <sup>240</sup>MSMLVLLP<sup>247</sup>, <sup>275</sup>EERKIKVYLP<sup>284</sup>, <sup>286</sup>MKMEEKYN<sup>293</sup>. As energias de fibrilação foram obtidas para o fragmento individual e para o conjunto de cinco sequências.

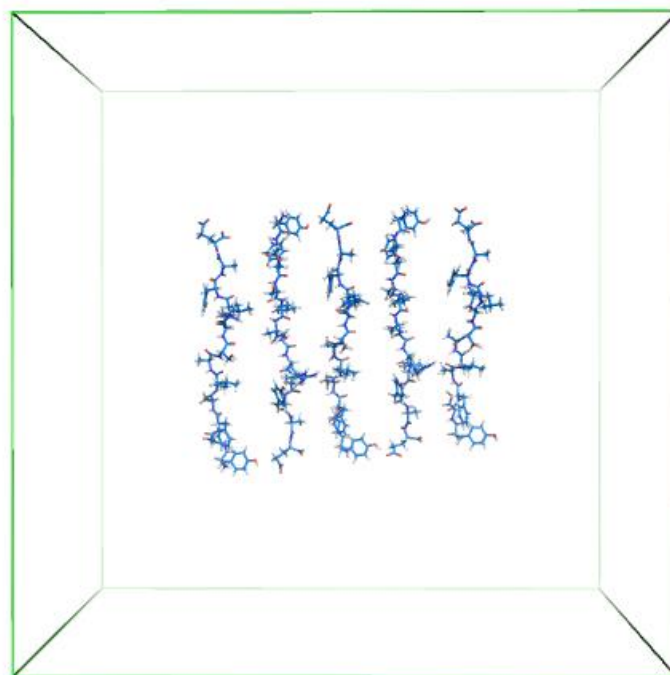
### 2.2.2 Preparação de estruturas

As estruturas proteicas utilizadas para simulações por MD foram obtidas com recurso ao *software antechamber* que contém a ferramenta “*leap*”, por inserção da sequência das proteínas desejadas, <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup> da proteína Aβ e dois fragmentos da sequência da proteína ovalbumina <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup> e <sup>173</sup>MVLVNAIVFKG<sup>183</sup>. Foram assim obtidas as estruturas em formato *pdb*, que foram seguidamente utilizadas para a obtenção dos ficheiros

correspondentes de topologia usando o campo de forças Amber99SB-ILDN [139], adequado para proteínas e ácidos nucleicos. No caso dos componentes dos líquidos iônicos utilizados, os parâmetros das ligações *nonbonded* para o tosilato foram retirados da referência [140], tendo os restantes parâmetros sido retirados do campo de forças GAFF [141]. Para o íon colínio foi usada a parametrização da referência [142]. No caso da parametrização do íon arginato, foram utilizados os parâmetros do campo de forças GAFF [141] com cargas atômicas parciais obtidas pela metodologia RESP [143].

### 2.2.3 Preparação de sistemas

Foram usados para o estudo da agregação, estruturas em forma de pentâmero constituídos pelas sequências dos três fragmentos escolhidos. Este pentâmero é uma estrutura composta por cinco fragmentos com a mesma sequência, dispostos manualmente numa conformação de folha- $\beta$  antiparalela, devido a evidências de esta ser a conformação preferencial para as fibrilas formadas com o fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  a pH neutro, não havendo nenhuma informação estrutural para os outros fragmentos em estudo [144], estando um exemplo de pentâmero apresentado na Figura 15. Com o mesmo pentâmero foram preparados três sistemas, o sistema controlo, apenas solvatado com água, e dois sistemas solvatados com água e líquido iónico, sendo estes [Cho][Arg] e [Cho][Tos]. A solvatação com água foi executada utilizando o modelo de água SPC/E em todos os sistemas e foram adicionadas as moléculas dos componentes dos líquidos iónicos, ou seja pares de moléculas de [Cho][Arg] e [Cho][Tos], nos sistemas respetivos, de forma a que os líquidos iónicos estejam em todos os sistemas numa concentração inicial de 0,5 M; a carga total dos sistemas foi neutralizada sempre que necessário, com a adição de iões cloreto, não havendo alteração do pH neutro do sistema, estando a constituição de todos os sistemas utilizados descrita na Tabela 2. Os terminais de todas as sequências em estudo não sofreram encapsulamento, devido às evidências do que o encapsulamento tem grande influência nas distribuições de cargas moleculares, o que por sua vez resulta em mudanças nas interações eletrostáticas no momento de agregação [145].



**Figura 15** - Pentâmero constituído por cinco cadeias do fragmento  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  de ovalbumina na conformação de folha- $\beta$  antiparalela.

**Tabela 2**- Constituição dos sistemas computacionais utilizados, estando representado o número de aminoácidos por “Nº AA”, o número de moléculas de água, líquido iónico e iões e o respetivo número total de moléculas para cada sistema, juntamente com o número de átomos total.

Sistema		Nº AA	Moléculas				Total de Átomos
			Água	Líquido iónico	Iões	Total	
Controlo	Pentâmero KLVFFA	30	2782	0	5	2787	8901
	Pentâmero YSFSLASRLYAE	60	23575	0	0	23580	71700
	Pentâmero MVLVNAIVFKG	55	16630	0	5	16640	50790
Água + [Cho][Arg] 0,5 M	Pentâmero KLVFFA	30	2329	28	5	2367	8830
	Pentâmero YSFSLASRLYAE	60	19916	220	0	20141	70843
	Pentâmero MVLVNAIVFKG	55	13546	181	5	13755	49864
Água + [Cho][Tos] 0,5 M	Complexo KLVFFA	30	2358	28	5	2396	8721
	Pentâmero YSFSLASRLYAE	60	20216	220	0	20441	70203
	Pentâmero MVLVNAIVFKG	55	13850	181	5	14041	49509

O número de moléculas de líquido iónico acrescentado para obter uma concentração inicial de 0,5 M foi calculado tendo em conta o volume inicial da caixa utilizada. Os sistemas

foram preparados em caixas de simulação utilizando condições periódicas de fronteira, tendo sido usado o *software Gromacs* versão 5.1.2 [146] para realizar as simulações. Foram executados primeiramente ciclos de minimização seguidos de ciclos de equilibração da temperatura e pressão do sistema, sendo por último realizada a etapa de produção.

A minimização foi primeiramente realizada com o algoritmo *steepest descent*, em que foi definido o número máximo de 500000 passos e um critério de convergência de força máxima inferior a  $10,0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ . Em seguida a equilibração da temperatura foi executada com recurso ao algoritmo *v-rescale* com um passo de integração de 0,002 ps, com um número máximo de 500000 passos para atingir a temperatura de 300 K, seguindo-se a equilibração da pressão que foi realizada com o baróstato Parrinello-Rahman, com a temperatura a ser mantida constante com o termóstato Nose-Hoover; com a pressão de referência de 1 bar. Por último, na etapa de produção foi usado um passo de integração de 0,002 ps com o número de passos de 25000000, correspondente aos 50 ns de simulação, tendo este procedimento sido repetido para os três sistemas de cada sequência proteica, com exceção do sistema relativo ao pentâmero  $^{73}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  no sistema com o líquido iónico [Cho][Tos] para o qual apenas foi realizada uma simulação de 46 ns. Em todo o procedimento foi usado o algoritmo LINCS que restringiu o tamanho das ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogénio.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Microscopia**

A verificação de formação de agregados na presença de líquidos iónicos foi primeiramente realizada laboratorialmente por avaliação macroscópica do aspeto das soluções, e seguidamente por microscopia, com obtenção de imagens microscópicas com luz polarizada em função do tempo. As imagens microscópicas foram obtidas a 0, 3 e 6 ou 7 dias. Em algumas soluções foi observada degradação bacteriana, pelo que os tempos de aquisição de imagens também se devem a este fenómeno.

##### **3.1.1 Estudo da agregação do fragmento da proteína A $\beta$ <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup>**

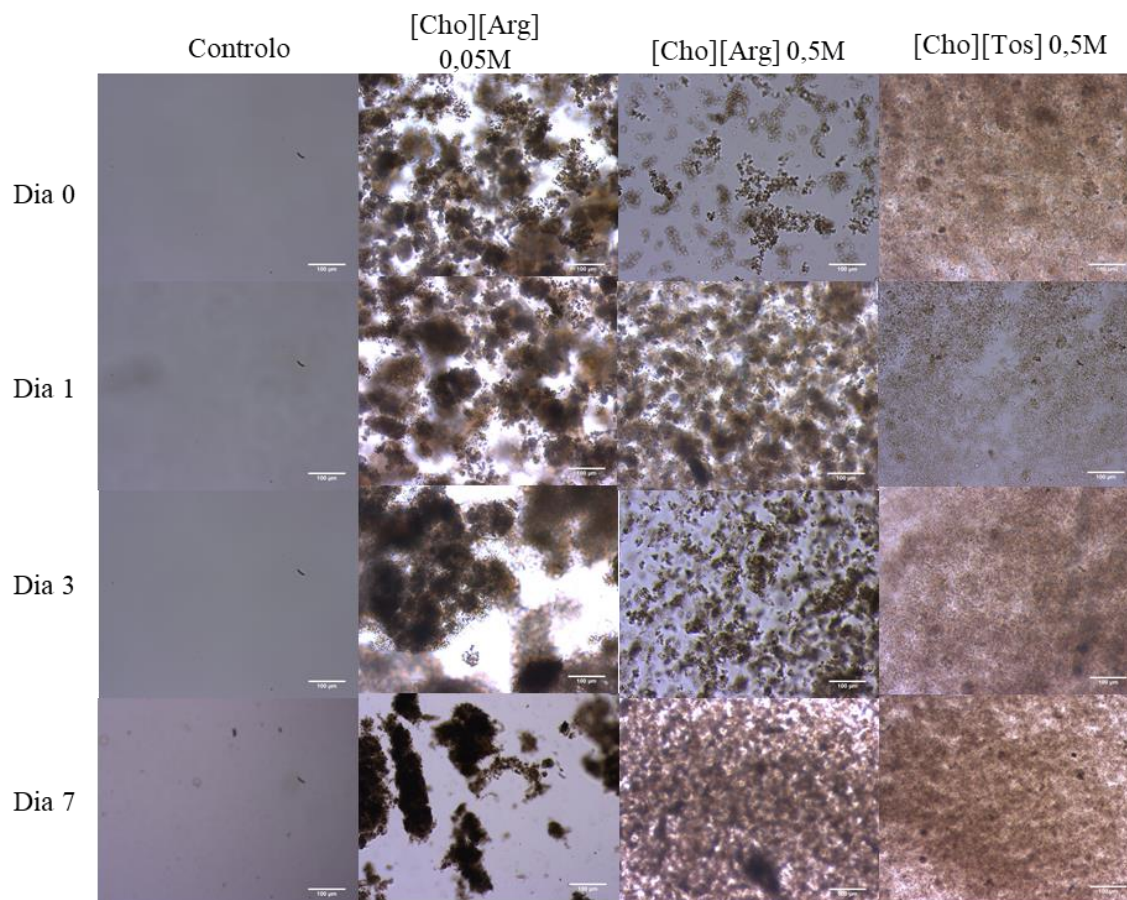
O estudo de agregação do fragmento da proteína amilóide foi realizado com o líquido iónico [Cho][Arg] nas concentrações de 0,05 e 0,5 M, e o líquido iónico [Cho][Tos] na concentração de 0,5 M, a pH 2 e a pH 7. Depois da preparação das soluções, foi verificado se existia alguma variação macroscópica no tempo  $t = 0$  dias. No estudo realizado a pH 2, verificou-se que não ocorreram alterações visíveis na solução controlo, mas foram visíveis diferenças imediatas no aspeto para as soluções com [Cho][Arg] nas concentrações de 0,05 e 0,5 M e para a solução com [Cho][Tos] 0,5 M, apresentadas na Figura 16. No caso das soluções com [Cho][Arg] a 0,05 M e [Cho][Tos] a 0,5 M foi observado que ambas as soluções ficaram turvas e opacas, com cor esbranquiçada, enquanto que no caso do [Cho][Arg] a 0,5 M foi verificado que se formou uma camada semelhante às soluções anteriormente referidas, mas apenas na superfície.



**Figura 16** - Aspeto das soluções com o fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  a pH 2, no tempo  $t = 0$  e 7 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo, soluções de [Cho][Arg] 0,05 e 0,5 M e de [Cho][Tos] 0,5 M.

Estas mesmas soluções foram usadas para o estudo microscópico, em que as imagens microscópicas obtidas se encontram apresentadas na Figura 17. É corroborada assim a formação de agregados proteicos no tempo  $t = 0$  dias, no entanto os agregados apresentavam morfologias diferentes. No caso da solução com [Cho][Arg] 0,05 M, são encontrados agregados proteicos com morfologia amorfa, mas separados entre si, enquanto que no caso do [Cho][Tos] são encontrados agregados proteicos totalmente compactos, ligados entre si. No caso da solução com [Cho][Arg] 0,5 M é verificado que existe já no tempo  $t = 0$  dias a formação de agregados, mas que são ainda muito pouco definidos. O estudo microscópico foi repetido no dia 1 e verificou-se que a solução com [Cho][Arg] a 0,05 M contém agregados proteicos mais compactos, tendo esta compactação aumentado até ao terceiro dia de estudo. Na solução com [Cho][Arg] 0,5 M os agregados são mais nítidos a partir do primeiro dia de estudo, e são encontrados pequenos agregados amorfos no dia 3, aumentando a sua compactação até ao tempo  $t = 7$  dias. No caso da solução com [Cho][Tos] 0,5 M, os agregados completamente compactos mantêm-se durante todo o tempo de estudo, desde  $t = 0$  dias até  $t = 7$  dias. O aspeto macroscópico das amostras apenas se alterou no caso da solução com [Cho][Arg] 0,5 M, estando relacionado com o aumento do número de agregados e a sua posterior compactação, tendo sido encontrado ao sétimo dia o mesmo aspeto para as soluções com [Cho][Arg] 0,05 M e [Cho][Tos] 0,5 M.





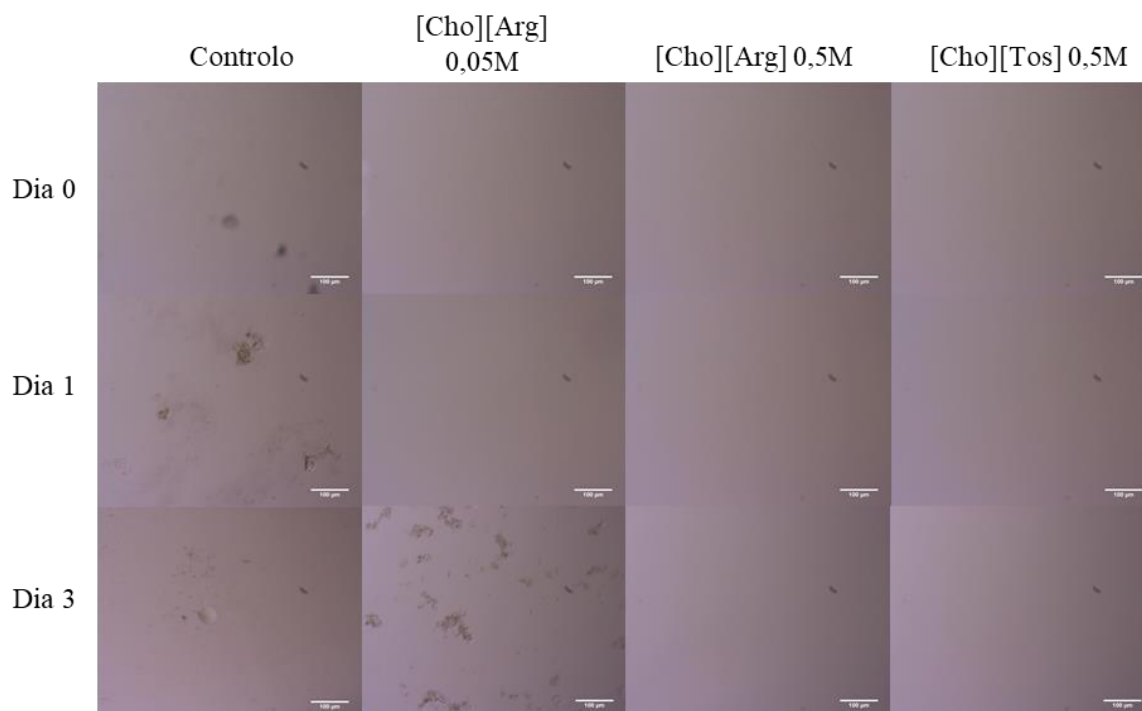
**Figura 17** - Evolução da formação de agregado proteicos do fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  no tempo  $t = 0, 1, 3$  e  $7$  dias para o estudo a pH 2, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo, constituídas pelo fragmento peptídico da proteína  $\text{A}\beta$  e água a pH 2, e soluções  $[\text{Cho}][\text{Arg}]$  0,05 M e 0,5 M e  $[\text{Cho}][\text{Tos}]$  0,5 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

Foi assim verificado que todas as soluções com líquidos iónicos estudadas permitiram a formação de agregados proteicos, apesar de não ser encontrada nenhuma estrutura fibrilar. Como já foi referido, existem vários fatores a ter em conta para o estudo da agregação visto que há um limite ténue entre a existência de agregados ou a total dissolução da proteína, e também entre a formação de agregados amorfos e a formação de agregados na forma de fibrilas amilóides. No caso das soluções preparadas a pH 7, foi visível no tempo  $t = 0$  dias uma mudança muito ténue apenas na solução controlo (ver Figura 18). Pelas imagens microscópicas da Figura 19, foi verificado a existência da formação de pequenos agregados proteicos de morfologia amorfa apenas na solução controlo. A única alteração ocorreu para a solução de  $[\text{Cho}][\text{Arg}]$  0,05 M em que, no terceiro dia de estudo, se

verificou o aparecimento de agregados de natureza também amorfa, tal como uma pequena mudança no seu aspeto macroscópico.



**Figura 18** - Aspeto das soluções com o fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , inicialmente a pH 7, no tempo  $t = 0$  e 3 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo, soluções de  $[\text{Cho}][\text{Arg}]$  0,05 e 0,5 M e solução de  $[\text{Cho}][\text{Tos}]$  0,5 M.



**Figura 19** - Evolução da formação de agregado proteicos do fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  no tempo  $t = 0, 1$  e 3 dias para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo,  $[\text{Cho}][\text{Arg}]$  0,05 M e 0,5 M e  $[\text{Cho}][\text{Tos}]$  0,5 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

Para a proteína A $\beta$  é verificado que a formação de fibrilas é similar entre intervalos de pH 7-9, enquanto que a pH ácido a taxa de fibrilação é reduzida [147]. No entanto, nenhuma das soluções testadas neste estudo com o fragmento <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup> levou à obtenção de fibrilas. No caso do fragmento <sup>12</sup>VHHQKLVFFAEDV<sup>24</sup> da proteína A $\beta$ , que inclui o fragmento utilizado neste trabalho, existem estudos realizados com o efeito do pH para a fibrilação, tendo sido verificado que a pH 2 o peptídeo encontra-se numa conformação sem estrutura secundária definida, com um pH crítico para a formação de agregados termoestáveis de 3 [148]. Assim, e tendo sido usado inicialmente um meio com pH 2 para o estudo da formação de agregados, esta pode ser uma razão para a formação de agregados sem estrutura secundária bem definida; no entanto, existe uma mudança no pH depois da inserção dos líquidos iónicos que precisa de ser tida em conta.

Existem estudos envolvendo a sequência completa da A $\beta$  onde foi reportado que o aumento da força iónica da solução de 50 para 500 mM favorece a formação de fibrilas [149], sendo que, apesar disso, existem também evidências que o aumento da força iónica pode ser desfavorável para a formação de fibrilas amilóides [150], [151]. Assim, é expectável que a força iónica favoreça ou desfavoreça o processo dependendo da combinação de iões utilizados para o efeito, mas também da sequência polipeptídica em estudo. No caso dos agregados obtidos para o fragmento da A $\beta$  <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup>, a diferença de 0,05 M para 0,5 M no caso das soluções com [Cho][Arg] não levou a mudanças suficientes para a alteração da formação de agregados amorfos para fibrilas, sendo o mesmo registado para o caso da solução contendo [Cho][Tos] 0,5 M no caso das soluções a pH 2, embora no caso das soluções que incluem líquidos iónicos a pH 7 apenas a solução com [Cho][Arg] 0,05 M tenha apresentado agregados.

Apesar do fragmento em estudo apresentar apenas 6 aminoácidos, este é o fragmento mais pequeno encontrado para a proteína A $\beta$  que apresenta tal como a sequência total, a capacidade de formação de fibrilas, com características similares. Por este motivo, o tamanho da cadeia não é um fator tido em consideração para a formação destes agregados, sendo esperado o mesmo tipo de comportamento com a utilização da sequência total da A $\beta$ . Por outro lado, é importante referir, que na sequência utilizada, a maioria dos aminoácidos são hidrofóbicos, sendo que a sequência KLVFFA é constituída pelos resíduos lisina, que apresenta carga positiva, leucina, valina, fenilalanina e alanina, sendo não polares. Esta percentagem elevada de aminoácidos hidrofóbicos tem um papel preponderante para ser

considerada uma sequência que forme estruturas filamentosas ou em folha- $\beta$ , tendo em conta também a posição em que eles se encontram [152]. Apesar disto, não há formação de agregados macroscópicos ou detetáveis na ampliação de microscopia ótica usada no estudo, para o controlo a pH 2, havendo por isso um favorecimento da formação de agregados proteicos amorfos na presença dos líquidos iónicos do que na solução apenas com água a pH 2, embora haja o mesmo comportamento da solução controlo a pH 7 e da solução com arginato de colínio 0,05 M a pH 7 na formação de agregados amorfos. É de salientar também que os estudos foram realizados à temperatura ambiente, o que pode influenciar o tempo necessário para a formação de agregados ou até de fibrilas devido à cinética da reação [153].

No caso das soluções contendo o fragmento da A $\beta$  preparadas inicialmente a pH 2, a mudança no pH por inserção dos líquidos iónicos é muito evidente para todas as concentrações testadas (Tabela 3). No entanto, é possível encontrar na gama final de valores de pH a formação de agregados amorfos. O pI deste fragmento é de 8,75, calculado pela ferramenta ExPASy [154], sendo que os valores encontrados de pH para as soluções preparadas inicialmente a pH 2 e também para a solução de [Cho][Arg] 0,05 M a pH 7 encontram-se bastante similares a estes e, por isso, a formação de agregados tende a ser favorecida pois o fragmento terá o seu mínimo de solubilidade [5].

**Tabela 3-** pH das soluções após 7 dias da sua preparação para o estudo efetuado a pH 2 e após 3 dias para o estudo efetuado a pH 7 do fragmento  $^{16}\text{KL}\text{VFFA}^{21}$  da proteína A $\beta$  com os líquidos iónicos [Cho][Arg] e [Cho][Tos].

	IL	Concentração IL / M	pH Final
pH 2	[Cho][Arg]	0,05	8,75
		0,50	8,62
	[Cho][Tos]	0,50	8,43
pH 7	[Cho][Arg]	0,05	8,93
		0,50	9,40
	[Cho][Tos]	0,50	9,38

### 3.1.2 Estudo da agregação da ovalbumina

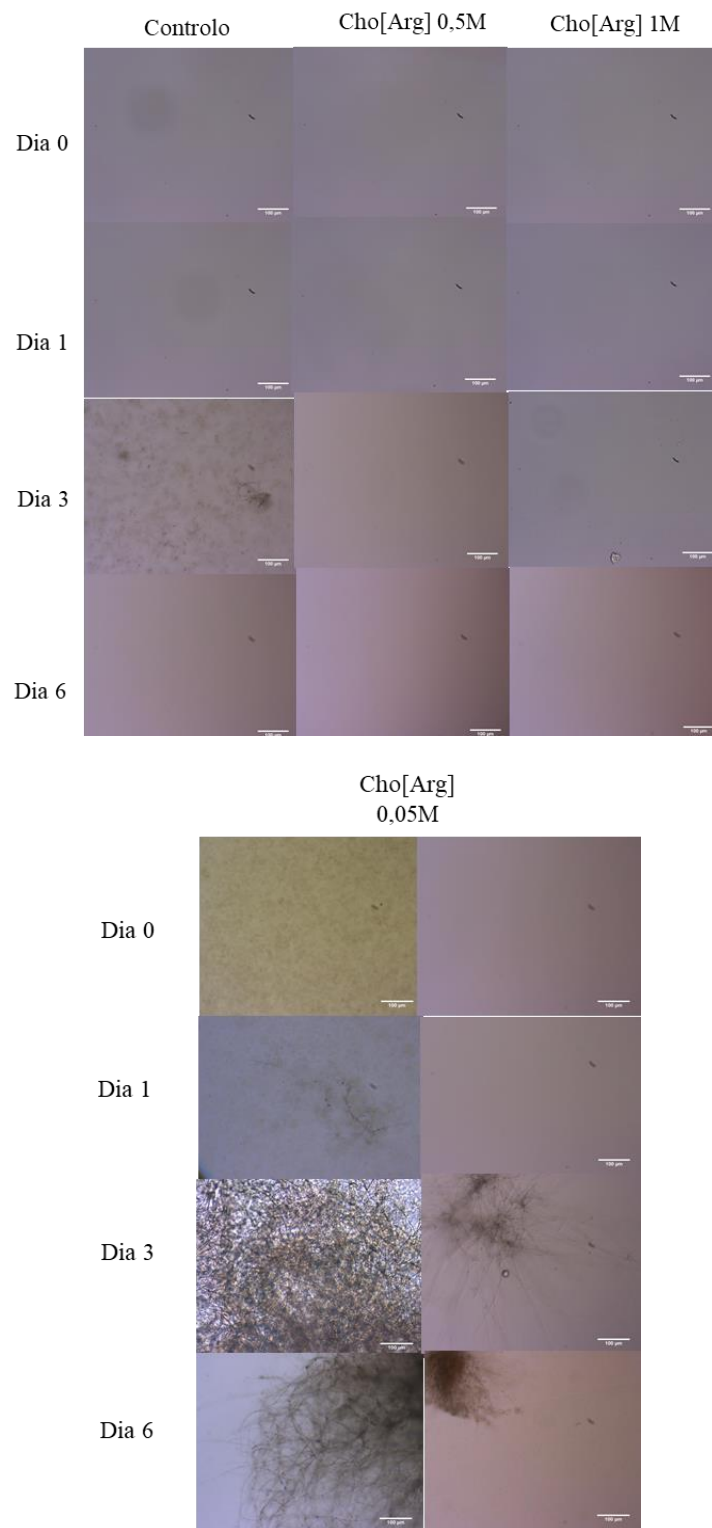
O estudo de agregação da ovalbumina foi realizado a pH inicial 2 e 7. Os resultados são apresentados individualmente para os dois líquidos iônicos, [Cho][Arg] e [Cho][Tos], utilizando três concentrações, 0,05, 0,5 e 1 M, juntamente com a solução controle.

#### 3.1.2.1.1 Soluções com arginato de colínio ([Cho][Arg])

O estudo da agregação da ovalbumina foi realizado com o [Cho][Arg] nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M e água pH 2/ PBS. Primeiramente para o pH 2, foram verificadas alterações macroscópicas das soluções no tempo  $t = 0$  dias (Figura 20). Para a solução de 0,05 M de líquido iônico verificou-se uma solução com aspeto turvo, enquanto que para as soluções de 0,5 e 1 M de líquido iônico, tal como o controle, não se verificou nenhuma alteração. Ao tempo  $t = 0$  dias, as imagens microscópicas das soluções com as concentrações de líquidos iônicos a 0,5 e 1 M, juntamente com a solução controle, não apresentaram nenhuma modificação (Figura 21). Apesar disso, na solução de 0,05 M de líquido iônico foi possível verificar a existência de pequenas fibrilas, que se formavam em diferentes tempos para as réplicas efetuadas, nomeadamente um dia depois do início do estudo e três dias após o seu início, apresentando um aumento de comprimento no decorrer do restante tempo de estudo.



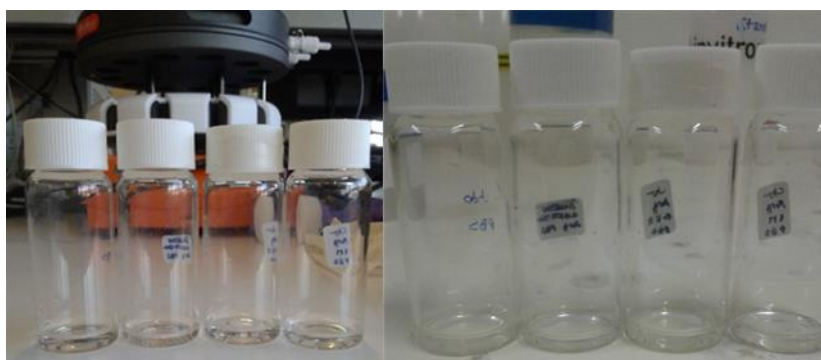
**Figura 20** - Aspeto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 2, no tempo  $t = 0$  e 6 dias respetivamente, estando representadas as soluções controle, e soluções de [Cho][Arg] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente.



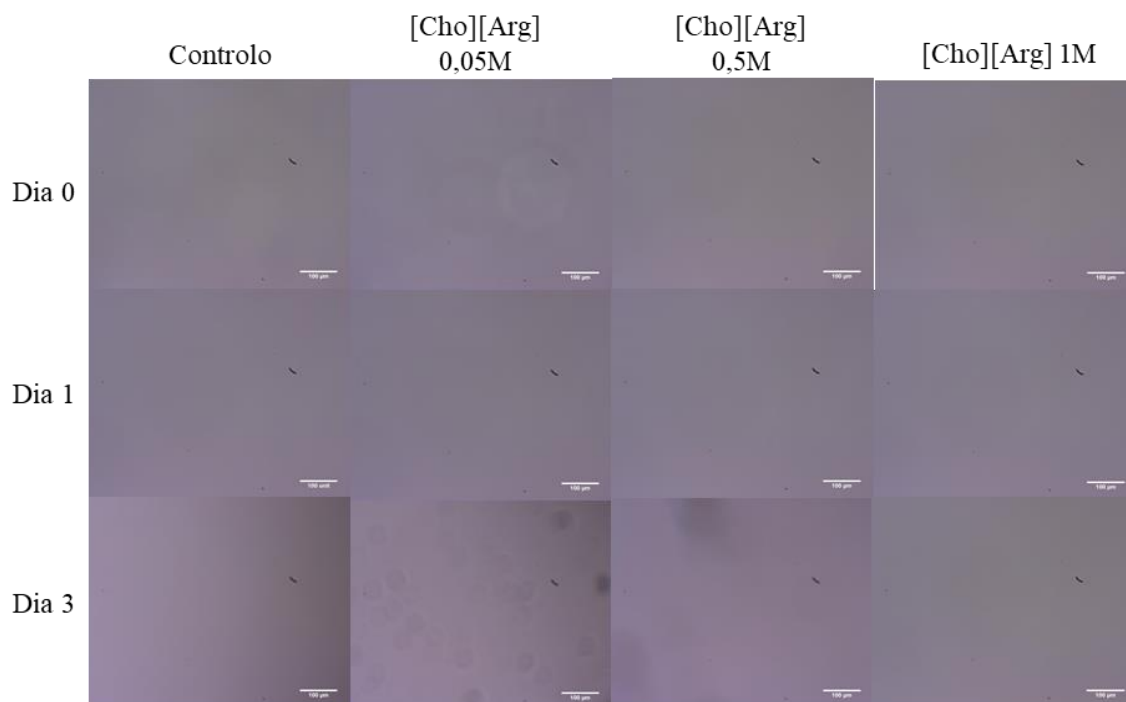
**Figura 21** - Evolução da formação de agregado proteico de ovalbumina no tempo  $t = 0, 1, 3$  e 6 dias para o estudo a pH 2 estando representadas as imagens microscópicas das soluções controle e soluções [Cho][Arg] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .



Apenas houve formação de agregados, na forma de fibrilas, para a solução com ovalbumina e [Cho][Arg] a 0,05 M. No entanto, devido às diferenças no tempo decorrido para o processo de fibrilação acontecer, é possível concluir que parâmetros não controlados, como a temperatura ou a força iônica da solução inicial, são determinantes para o desenrolar do processo, e de importância essencial para compreender inteiramente o mecanismo de fibrilação. No caso das soluções preparadas a pH 7, não houve nenhuma alteração no aspecto macroscópico no tempo  $t = 0$  dias, para todas as soluções em estudo, tal como apresentado na Figura 22. O mesmo foi verificado pelas imagens microscópicas que não apresentam nenhuma estrutura do tipo agregado (Figura 23). Nenhuma alteração nas soluções foi encontrada no tempo de estudo de apenas 3 dias, devido ao aparecimento de degradação bacteriana nas soluções a partir deste período.



**Figura 22** - Aspecto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 7, no tempo  $t = 0$  e 3 dias, estando representadas as soluções controlo e soluções [Cho][Arg] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente.



**Figura 23** - Evolução da formação de agregados proteicos de ovalbumina no tempo  $t = 0, 1$  e 3 dias para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e [Cho][Arg] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100 µm.

Avaliando o pH final de todas as amostras em estudo (Tabela 4), é possível verificar que as mesmas concentrações de líquido iónico em soluções preparadas inicialmente a pH diferente, apresentam o mesmo pH no final do tempo de estudo. A solução em que foi encontrada fibrilação apresentava o pH mais baixo. No entanto, a sua diferença de pH para os restantes (de aproximadamente 0,4), não parece ser o fator determinante para a ocorrência de fibrilação ou a total ausência de agregados.

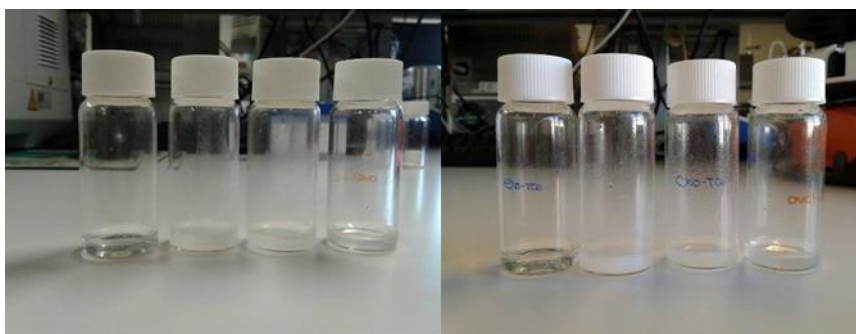
**Tabela 4** - pH das soluções após 6 dias da sua preparação para o estudo a pH 2, e após 3 dias para o estudo realizado a pH 7, para a ovalbumina com o líquido iónico [Cho][Arg].

	IL	Concentração / M	pH Final
pH 2	[Cho][Arg]	0,05	8,86
		0,50	9,68
		1,00	9,90
pH 7		0,05	9,28
		0,50	9,72
		1,00	9,77

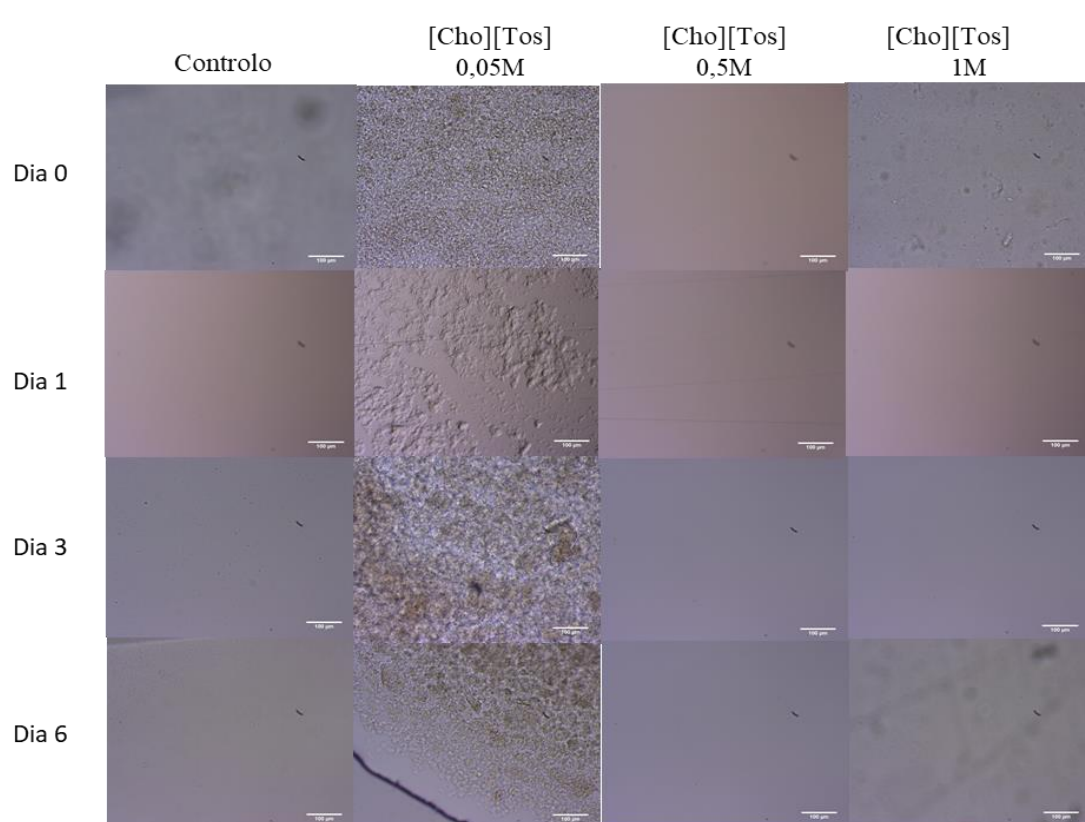


### 3.1.2.2 Soluções com tosilato de colínio ([Cho][Tos])

O estudo da agregação da ovalbumina foi realizado para o líquido iónico [Cho][Tos] nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M e água pH 2/ PBS. Primeiramente para o pH 2, no tempo  $t = 0$  dias foram analisadas as alterações macroscópicas no aspeto das soluções, representadas na Figura 24. Imediatamente após a adição de líquido iónico à solução de ovalbumina e água ocorreram alterações na turbidez das soluções correspondentes à solução com ovalbumina + [Cho][Tos] 0,05 M, e nenhuma alteração visível na solução controlo e nas soluções com concentração de 0,5 e 1 M de líquido iónico. As mesmas soluções foram usadas para obtenção de imagens microscópicas (Figura 25), em que se verificou a existência de agregados proteicos na solução com concentração de 0,05 M de líquido iónico, não havendo nenhum agregado formado na imagem do controlo nem nas soluções de [Cho][Tos] 0,5 e 1 M, de acordo com as alterações que as soluções apresentavam. O aspeto das soluções foi novamente verificado passados 3 dias, não havendo nenhuma alteração comparativamente ao aspeto inicial das amostras; as imagens microscópicas para o mesmo intervalo de tempo revelaram novamente agregados na solução de 0,05 M de líquido iónico, não se verificando nenhuma formação de agregados para as soluções 0,5 e 1 M de [Cho][Tos] e para a solução controlo mais uma vez. O mesmo estudo realizado ao fim de seis dias não revela também nenhuma mudança nas soluções.

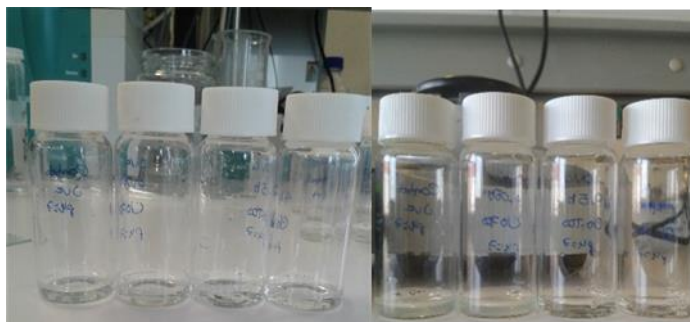


**Figura 24** - Aspeto das soluções de ovalbumina, inicialmente a pH 2, no tempo  $t = 0$  e 6 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo e soluções [Cho][Tos] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente.

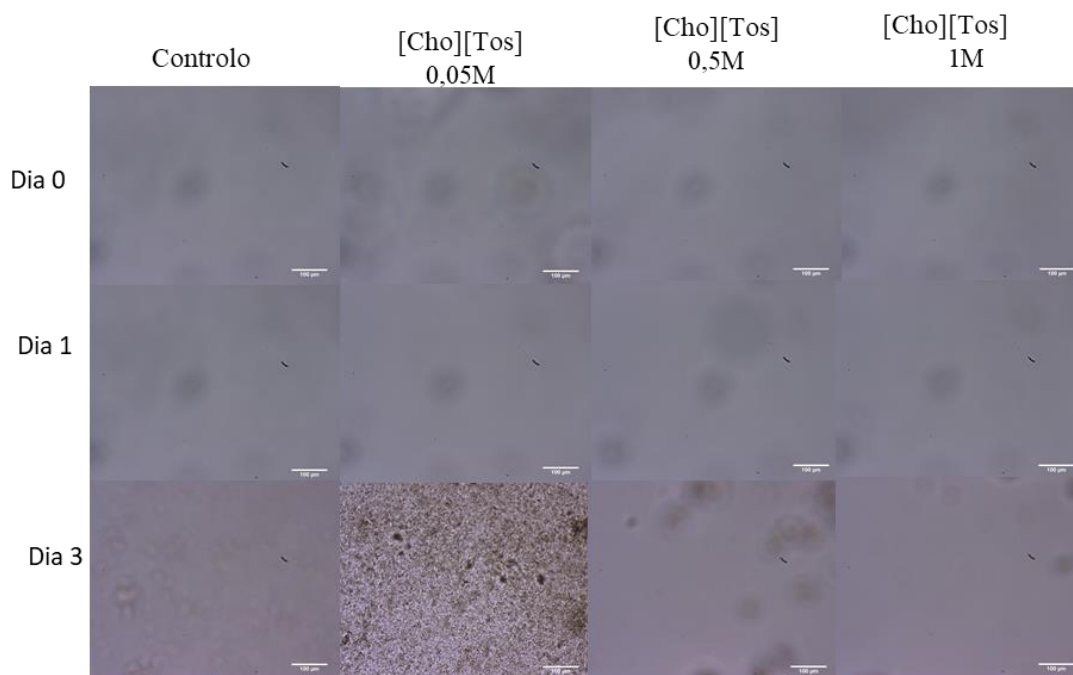


**Figura 25** - Evolução da formação de agregado proteicos de ovalbumina no tempo  $t = 0, 1, 3$  e 6 dias, para o estudo a pH 2, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controlo e [Cho][Tos] 0,05 M ,0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

Foi assim verificada a existência da formação de agregados na solução com a concentração de 0,05 M de líquido iónico e nenhum tipo de agregados nas restantes concentrações testadas. No caso das amostras com a solução de proteína preparada a pH 7 foi verificado inicialmente pelo aspeto macroscópico que não houve nenhuma alteração nos aspetos de todas as amostras em estudo (visualizar Figura 26), tendo o mesmo sido também confirmado pelas imagens microscópicas representadas na Figura 27. No decorrer do tempo de estudo, apenas houve alteração no aspeto macroscópico da solução de 0,05 M de [Cho][Tos] no terceiro dia, em que foi também verificado pelas imagens microscópicas a presença de agregados proteicos do tipo amorfo.



**Figura 26** - Aspetto das soluções com ovalbumina, inicialmente a pH 7, no tempo  $t = 0$  e 3 dias, estando representadas as soluções controle e soluções [Cho][Tos] 0,05, 0,5 M e 1 M, respetivamente.



**Figura 27** - Evolução da formação de agregado proteicos de ovalbumina no tempo  $t = 0,1$  e 3 dias, para o estudo a pH 7, estando representadas as imagens microscópicas das soluções controle e [Cho][Tos] 0,05 M, 0,5 M e 1 M, respetivamente, com recurso a uma ampliação de 10x; imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

Foi possível verificar que apenas houve a formação de agregados para a solução de 0,05 M de [Cho][Tos], enquanto que as restantes não apresentaram nenhuma forma de agregado. Para além disso, foi também verificado pela análise do pH no final dos estudos, (Tabela 5) que os agregados se formaram nas soluções que apresentam valores de pH na gama ácida. Este pode ser um fator que não levou a mudanças na conformação de proteína desejadas.

**Tabela 5** - pH das soluções após 6 dias da sua preparação para o estudo a pH 2 e após 3 dias para o estudo realizado a pH 7 para a proteína ovalbumina com o líquido iónico [Cho][Tos].

	IL	Concentração IL / M	pH Final
pH 2	[Cho][Tos]	0,05	2,50
		0,50	8,20
		1,00	9,00
pH 7		0,05	5,14
		0,50	9,14
		1,00	9,51

No protocolo utilizado e no estudo a pH 2, o ácido foi usado para a desnaturação da proteína, permitindo a exposição dos resíduos hidrofóbicos. Este facto pode favorecer o processo de agregação, tal como se verifica pela presença de agregados num tempo de estudo mais curto com este passo de desnaturação, do que com as soluções preparadas a pH 7 inicialmente no estudo com o [Cho][Tos]. A ovalbumina apresenta um pI de 4,1, e em meios com pH próximo deste valor e na presença de grande força iónica, as forças eletrostáticas vão ser fracas, permitindo que as interações hidrofóbicas intermoleculares induzam a formação de agregados amorfos [155]. Apesar disto, a adição de líquidos iónicos às soluções leva a um aumento de pH, o que parece ter um papel preponderante na conformação adotada pelos agregados, levando portanto à existência de morfologias diferentes para os agregados formados. Assim, é necessário controlar o pH e também outros parâmetros, como a temperatura e força iónica, para se concluir acerca do efeito dos líquidos iónicos no mecanismo de agregação.

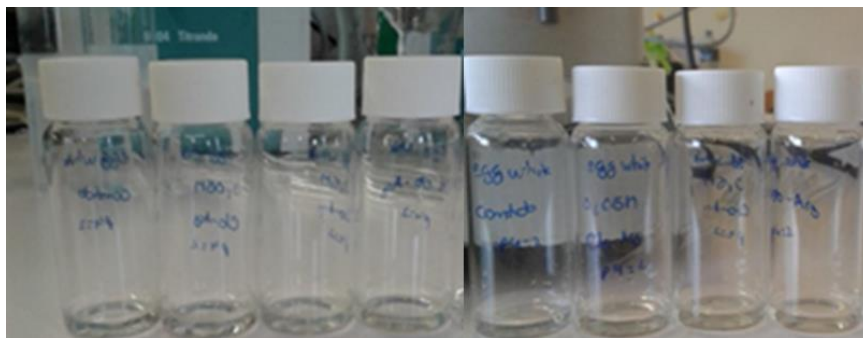
A formação de agregados da ovalbumina é principalmente obtida por desnaturação térmica, entre 75 e 80 °C. Foi verificado que este fator apenas influencia a taxa de agregação de proteínas globulares, como é o caso, e não a estrutura que eles apresentam, sendo esta variável dependente de fatores como o pH e a força iónica do meio [156]. A pH neutro e a altas temperaturas, a estrutura dos agregados fibrilares, que apresentam propriedades semi-flexíveis, são constituídos por monómeros, e têm um maior comprimento do que os obtidos em condições de baixa força iónica. Apesar disso, a ramificação das fibrilas aumenta com o aumento da força iónica do meio, mas a estrutura global das fibrilas mantém-se até concentrações de 100 mM NaCl [157]. Avaliando todos os resultados obtidos com a ovalbumina, foi verificado com o líquido iónico [Cho][Arg] que só existe a formação de

agregados na forma de fibrilas na concentração de 0,05 M, apesar da variação no seu tempo de formação, enquanto que com a utilização de [Cho][Tos] foi verificada a formação de agregados na concentração de 0,05 M apenas. Assim, é verificado que os líquidos iônicos induzem uma modificação no comportamento da proteína, verificando-se a formação de diferentes agregados (morfologicamente), sendo que a pH 2 há um favorecimento da formação de fibrilas pela ovalbumina com o líquido iônico [Cho][Arg] a 0,05 M, enquanto que com o [Cho][Tos] a formação de agregados morfologicamente amorfos é encontrada para a mesma concentração, com a diferença que a pH 7 são também encontrados agregados, mas com maior tempo de estudo, havendo assim um favorecimento da agregação a pH 2.

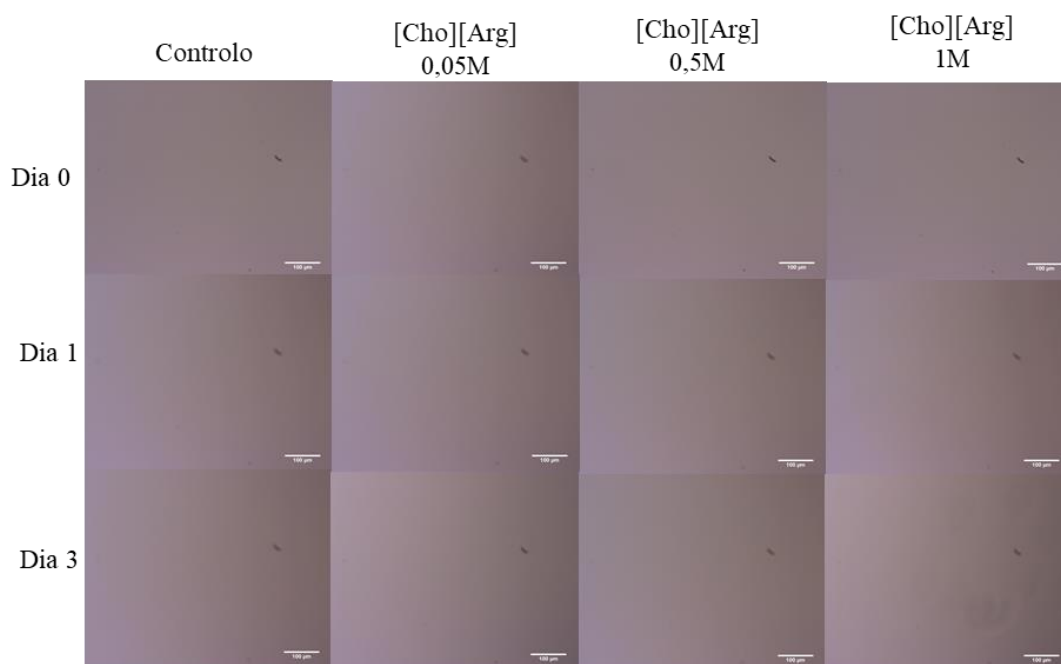
### **3.1.3 Estudo da agregação das proteínas totais da clara de ovo com líquidos iônicos**

No caso da clara do ovo, já existe reportado na literatura a ocorrência de agregados proteicos, na forma de fibrilas amilóides, na presença do líquido iônico [Cho][Tos] com desnaturação a pH 2, com as concentrações 0,1 e 1 M [82]. Por esta razão, este estudo decorreu apenas com a solução inicial de proteína a pH 2 com o líquido iônico [Cho][Arg]. Devido ao estudo já realizado com a ovalbumina, foram estudadas as mesmas concentrações de líquido iônico (0,05, 0,5 e 1 M), com o objetivo de comparar o comportamento da ovalbumina com as proteínas totais da clara do ovo.

Foi verificado ao tempo  $t = 0$  dias que não existe nenhuma alteração significativa em nenhuma das soluções preparadas, mantendo-se límpidas (Figura 28). Pelas imagens microscópicas verificou-se que não existe nenhum sistema com agregados formados, tal como apresentado na Figura 29, e em todo o decorrer do estudo não houve nenhuma alteração nas amostras. Não foi detetado nenhum tipo de agregação em todas as soluções a diferentes concentrações de líquidos iônico, sendo que tal como nas imagens microscópicas, o aspeto das soluções manteve-se igual no decorrer da experiência.



**Figura 28** - Aspeto das soluções com as proteínas totais da clara do ovo, inicialmente a pH 2 no tempo  $t = 0$  e 3 dias, respetivamente, estando representadas as soluções controlo e [Cho][Arg] 0,05, 0,5 e 1 M, respetivamente.



**Figura 29** - Evolução da formação de agregados das proteínas totais da clara do ovo no tempo  $t = 0$ , 1 e 3 dias a pH 2 inicial, para as soluções controlo e soluções [Cho][Arg] 0,05, 0,5 e 1 M, usando uma ampliação de 10x, imagens com escala incorporada equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

A avaliação do pH final das soluções foi também realizada (ver Tabela 6), sendo que as soluções com diferentes concentrações têm valores muito semelhantes, apresentando-se próximos do pH obtido para as soluções com ovalbumina, apesar de não haver nenhum tipo de agregação macroscópica e microscopicamente visível na ampliação utilizada para as proteínas totais da clara do ovo. Assim, e apesar do esperado, não foi observado nenhum tipo de agregado em nenhuma das concentrações estudadas. Os resultados obtidos para a solução com [Cho][Arg] 0,5 M e 1 M foram semelhantes aos obtidos para a ovalbumina,

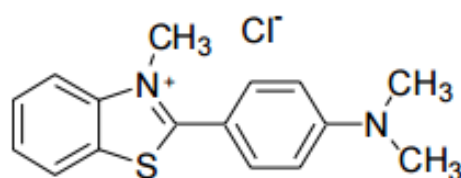
mas no caso da solução de 0,05 M não foi visível a formação de fibrilas nem de agregados amorfos.

**Tabela 6** - pH das soluções após 3 dias da sua preparação para o estudo a pH 2 para as proteínas totais da clara do ovo com o líquido iônico [Cho][Arg].

	IL	Concentração IL / M	pH Final
pH 2	[Cho][Arg]	0,05	8,75
		0,50	9,77
		1,00	10,44

### 3.2 Ensaio de fluorescência com Tioflavina T (ThT)

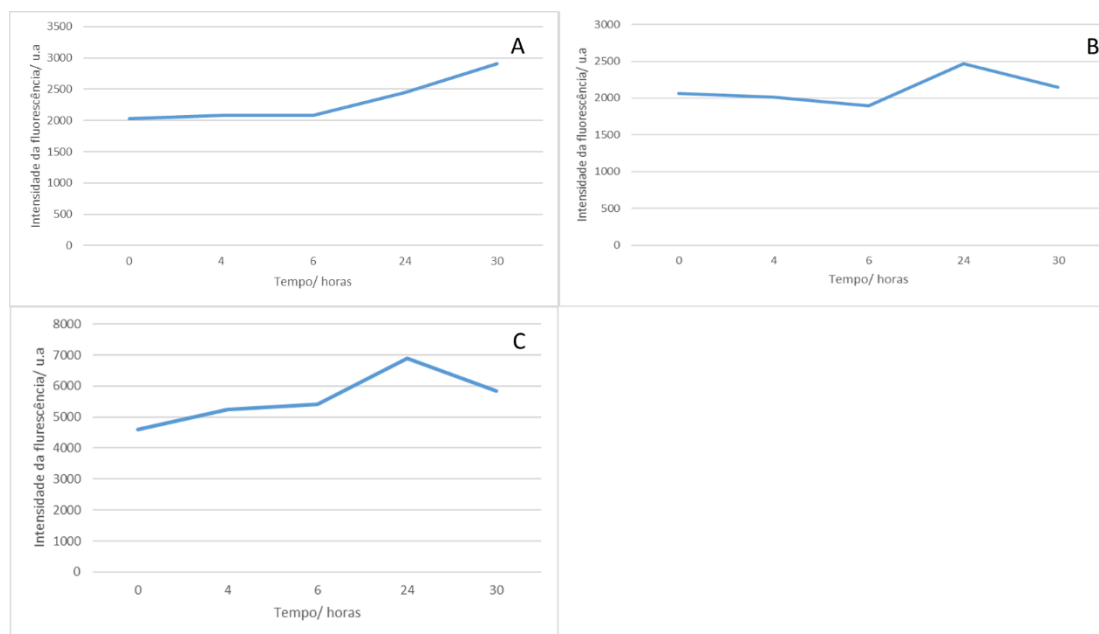
Existem várias técnicas para identificar e quantificar a presença de fibrilas amilóides, tais como o uso de fluorescência com Tioflavina T (ThT) ou vermelho Congo, e técnicas de microscopia como microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica [158]. Neste estudo foi utilizada a ThT para monitorizar a formação de fibrilas amilóides *in vitro*, na presença de líquidos iônicos. Esta molécula apresenta a propriedade de formar complexos fluorescentes com fibrilas do tipo amilóide, devido à sua conformação em folha- $\beta$ . A fluorescência desta sonda aumenta pela ligação específica a fibrilas do tipo amilóide, sendo visível no seu espectro de emissão a intensificação de um pico aos 482 nm, sendo que a concentração de ThT ligada às fibrilas é também proporcional ao comprimento total da fibrila. A estrutura da Tioflavina T apresenta um grupo dimetilamina ligado a um grupo fenil, que por sua vez se encontra ligado a um grupo benzotiazol, ligado a um terminal hidrofóbico, tal como representado na Figura 30 [158].



**Figura 30** - Estrutura da Tioflavina T, sonda fluorescente, que exibe um pico aos 482 nm quando se liga a estruturas com conformação em folha- $\beta$ .

Com os dados obtidos pelo estudo de microscopia, é necessário verificar se as estruturas filamentosas encontradas nas soluções de [Cho][Arg] 0,05 M com pH 2, apresentam uma conformação em folha- $\beta$ , para que possam ser classificadas como fibrilas amilóides, e se os agregados que têm aspeto amorfo apresentam localmente conformação em folha- $\beta$ . Assim, com esse objetivo foi estudada a fluorescência por ThT na solução de ovalbumina a pH 2 de [Cho][Arg] 0,05 M, tendo a mesma concentração sido utilizada para a solução de [Cho][Tos]. Neste contexto, era esperado que não houvesse aumento de intensidade de fluorescência para a solução com o líquido iónico [Cho][Tos], devido à ausência de fibrilas nas imagens microscópicas. Apesar disto, é verificado nos espectros de fluorescência, apresentados da Figura 31, que a solução com o líquido iónico anteriormente referido, apresenta um comportamento diferente do expectável, havendo um aumento da fluorescência em função do tempo. Este facto pode advir de estes agregados visualmente classificados com morfologia amorfa terem características fibrilares locais, ou seja, estrutura secundária em folha- $\beta$  localmente, que podem ser detetadas pela Tioflavina T e isso ter como consequência o aumento da fluorescência [159], [160]. No caso do espectro de fluorescência da solução com [Cho][Arg], é verificado que este apresenta o mesmo comportamento que o controlo e, por isso, podemos concluir que as fibrilas encontradas nas imagens microscópicas não são do tipo amilóide, já tendo este tipo de fibrila sido encontrado para a ovalbumina, submetida a desnaturação a pH 2 e com posterior incubação a 90°C [68].





**Figura 31** - Intensidade da emissão de fluorescência da ThT a 482 nm em função do tempo para a ovalbumina no sistema: A-controle, B-[Cho][Arg] 0,05 M e C-[Cho][Tos] 0,05 M.

É possível concluir que os líquidos iônicos interagem de forma diferente com as sequências em estudo, devido às diferentes morfologias dos agregados formados e também pelas diferentes estruturas secundárias encontradas pelo estudo de fluorescência pela Tioflavina T. Estes dados permitem concluir que a presença de líquidos iônicos no meio altera o mecanismo de formação de agregados. Por este motivo, é importante perceber quais os tipos de interação dos líquidos iônicos com os aminoácidos (estrutura primária das proteínas). Com este objetivo, foram utilizadas simulações de MD para estudar estas interações com vários modelos proteicos. No caso do fragmento da proteína A $\beta$ , a sequência estudada é semelhante à usada no estudo laboratorial, embora no caso da ovalbumina não seja possível simular a proteína completa devido ao tamanho excessivo do sistema e ao custo computacional associado. Por tal razão, selecionaram-se fragmentos desta proteína para comparar com os resultados obtidos laboratorialmente.

### 3.3 Seleção dos fragmentos da ovalbumina para o estudo de MD

Para o estudo computacional é necessário recorrer a peptídeos modelo, fragmentos de proteínas que apresentam as mesmas características da sequência total, para que seja possível simular o sistema computacionalmente. Assim, e para o estudo com a proteína ovalbumina, não é viável realizar simulações com a sequência completa, e por isso foram selecionados fragmentos que possam ser usados como modelos. Para esta seleção, e com o objetivo de estudar o fenómeno de agregação, foi usado o algoritmo PASTA 2.0, *prediction of amyloid structural aggregation* [138]. Este algoritmo verifica quais são as regiões da sequência proteica que podem eventualmente formar uma folha- $\beta$  com as cadeias vizinhas, com recurso a uma base de dados de proteínas globulares com estruturas nativas conhecidas e que depende do pressuposto que a proteína se encontra na sua forma solúvel e nativamente destruturada. Tem como entrada uma sequência de aminoácidos e como saída a energia de propensão para formação de fibrilas amilóides (medida meramente qualitativa).

Avaliando os resultados obtidos, apresentados na Tabela 7, foram selecionados para o estudo fragmentos que apresentam mudanças de energia favoráveis na passagem da presença de um fragmento para cinco fragmentos. Assim, tendo em conta este critério, foi escolhido primeiramente o fragmento da ovalbumina  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , que apresenta inclusivamente uma energia de fibrilação mais favorável que o fragmento da A $\beta$  também em estudo. Foi também escolhido o fragmento  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  pelo facto de apresentar uma energia prevista de fibrilação mais favorável na presença de cinco fragmentos, do que o fragmento  $^{195}\text{QAVHAAHAEI}^{202}$ , o único restante que não foi excluído pelo critério anterior. No caso do fragmento  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , este fragmento já se encontra identificado na literatura, por vários algoritmos como o Tango que permite identificar a alta propensão para agregação na conformação de folha- $\beta$ , como um fragmento modelo para o estudo da fibrilação [65]. Estes fragmentos proteicos foram os escolhidos para formar um pentâmero, cinco cadeias da mesma sequência, em conformação de folha- $\beta$ , como uma fibrila amilóide de comprimento reduzido, que permite o estudo da estabilidade em diferentes sistemas, como na presença de líquidos iónicos.

**Tabela 7** - Dados de fragmentos da sequência total da proteína ovalbumina, com número de aminoácidos (AA) hidrofóbicos, a sua percentagem na sequência e a melhor energia para a fibrilação, estando também apresentados os dados para o fragmento do peptídeo beta amiloide, para efeitos de comparação (dados obtidos pelo algoritmo Pasta 2.0 no dia 5 de Junho de 2017).

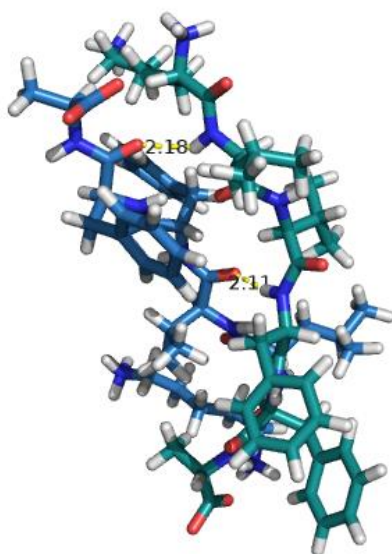
Sequência	Nº de AA	Nº de AA hidrofóbicos	% AA hidrofóbicos	Melhor energia para fibrilação / <sup>1</sup> PEU
<sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup> -Aβ	6	5	83,3	-4,539
Pentâmero KLVFFA	30	25		-15,338
<sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup>	12	7	58,3	-1,377
Pentâmero YSFSLASRLYAE	60	35		-2,770
<sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup>	11	8	72,7	-9,287
Pentâmero MVLVNAIVFKG	55	40		-35,739
<sup>195</sup> QAMPFRVT <sup>202</sup>	8	5	62,5	-1,725
Pentâmero QAMPFRVT	40	25		-1,725
<sup>204</sup> ESKPVQMMYQIGLFRVASM <sup>224</sup>	19	11	57,9	-3,199
Pentâmero ESKPVQMMYQIGLFRVASM	95	55		-3,199
<sup>227</sup> KMKILELP <sup>234</sup>	8	5	62,5	-2,213
Pentâmero KMKILELP	40	25		-2,213
<sup>240</sup> MSMLVLLP <sup>247</sup>	8	7	87,5	-4,453
Pentâmero MSMLVLLP	40	35		-4,453
<sup>275</sup> EERKIKVYLP <sup>284</sup>	10	4	40,0	-3,828
Pentâmero EERKIKVYLP	50	30		-3,828
<sup>286</sup> MKMEEKYN <sup>293</sup>	8	2	25,0	-0,371
Pentâmero MKMEEKYN	40	10		-0,371
<sup>326</sup> QAVHAAHAEI <sup>335</sup>	10	6	60,0	-0,920
Pentâmero QAVHAAHAEI	50	30		-2,042

<sup>1</sup>PEU- *Pasta energy units*, equivalente a 1,192 Kcal/mol

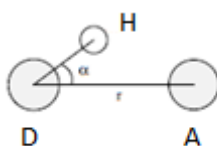
### 3.4 Avaliação das ligações de hidrogénio inter-cadeias proteicas

Para todos os sistemas em estudo, foi feita uma análise da trajetória obtida durante 50 ns de dinâmica molecular que permitiu avaliar a estabilidade dos agregados formados, o tipo de conformação adotada e o efeito do líquido iónico nos sistemas. Porém, o tempo de 50 ns é limitado, não sendo de todo possível ver o processo de agregação completo de proteínas, que pode durar de segundos a horas, mas que permite verificar quais são os primeiros eventos moleculares que decorrem nos pentâmeros previamente formados, as interações proteína-proteína, entre vários outros parâmetros.

Com o objetivo de verificar a estabilidade do pentâmero ao longo do tempo da simulação, foi primeiramente estudado o número de ligações de hidrogénio entre *backbones* das 5 cadeias peptídicas dos três fragmentos selecionados, nos sistemas controlo e com os líquidos iónicos [Cho][Arg] e [Cho][Tos]. Para isso, foram identificados os átomos dadores e aceptadores do *backbone* das cinco cadeias que têm a possibilidade de formar ligações de hidrogénio, tal como apresentado na Figura 32. Os critérios para a existência de ligações de hidrogénio entre dois átomos são estarem a uma distância  $r \leq 0,35$  nm e formarem um ângulo  $\alpha \leq 30^\circ$ , representado na Figura 33. Foi possível obter também o número de pares de átomos que apenas cumpriam o critério da distância, não apresentando o ângulo adequado à formação de ligações de hidrogénio, estando representados nos resultados por pares a distâncias inferiores a 0,35 nm.



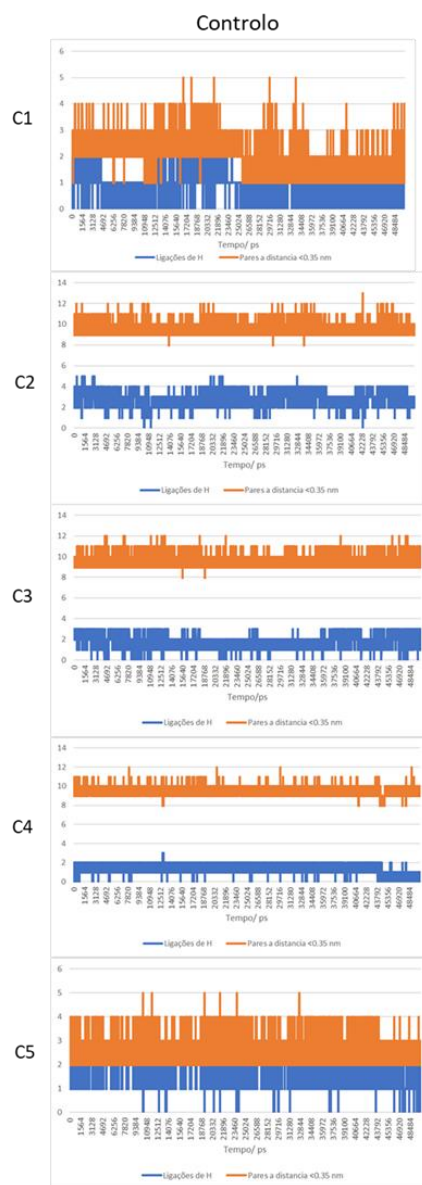
**Figura 32** - Exemplo de ligações de hidrogénio entre *backbone* de duas cadeias do fragmento da proteína A $\beta$ , <sup>16</sup>KLFFFA<sup>21</sup>, com a distância apresentada em Å.



**Figura 33** - Critérios para a existência de uma ligação de hidrogénio, estando representado o átomo H, um dador, letra D, aceitador, letra A,  $r$  a distância entre o dador e o aceitador, e o ângulo  $\alpha$ , formado entre os três elementos.

É possível verificar, para todos os sistemas em estudo, que as cadeias terminais (representadas por C1 e C5), apresentam um comportamento diferente comparando com as cadeias inseridas na parte central do pentâmero, sendo o número de ligações de hidrogénio efetivas muito próximo do número de pares de átomos que apenas cumprem o requisito da distância; também pelo facto de não terem ligações de hidrogénio nos dois lados da cadeia, como nas restantes, C2, C3 e C4. Analisando as ligações de hidrogénio entre os três sistemas controlo (sistema com água, [Cho][Arg] e [Cho][Tos]) para o fragmento da A $\beta$ , podemos verificar que o número de ligações de hidrogénio efetivas é bastante semelhante para os três sistemas, não havendo uma diferença evidente na comparação sistema controlo e sistema com líquidos iónicos. Este resultado é contrário ao que seria de esperar, sendo esperado que os líquidos iónicos tivessem efeito estabilizador ou destabilizador na conformação das

cadeias peptídicas, em comparação com o sistema controlo, podendo o número de ligações de hidrogénio efetivas ser utilizado para avaliar esta estabilidade (ver Figuras 34 e 35).



**Figura 34** - Número de ligações de hidrogénio intermoleculares e número de pares de átomos (aceitador e dador) a distância inferior a 0,35 nm, mas que não se encontram a ângulo adequado para formar ligações de hidrogénio para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ .



**Figura 35** - Número de ligações de hidrogénio e número de pares de átomos (aceitador e dador) a distância inferior a 0,35 nm, mas que não se encontram a ângulo adequado para formar ligações de hidrogénio para os sistemas com o líquido iónico [Cho][Arg] e [Cho][Tos] do pentâmero constituído pela sequência <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup>.

Fazendo a mesma análise para os resultados obtidos para os fragmentos selecionados como modelos da proteína ovalbumina, é verificado o mesmo comportamento díspar entre as cadeias terminais e as centrais. No caso do fragmento  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  é possível verificar que o número de ligações de hidrogénio encontrado para os três sistemas é muito diminuído, comparando com os 12 aminoácidos que cada cadeia apresenta, sendo que o máximo de ligações de hidrogénio encontrado é de 5, no caso do controlo, e 3, no caso dos dois sistemas com líquidos iónicos, avaliando as cinco cadeias individualmente. No caso do fragmento  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  o máximo de número de ligações de hidrogénio é 5 para o controlo e de 4 para os sistemas com líquidos iónicos, apresentando 11 aminoácidos por cadeia (ver anexo B, Figuras B. 1-4).

No caso dos dois fragmentos da ovalbumina, estes possuem aminoácidos que apresentam capacidade de formar ligações de hidrogénio também na cadeia lateral, sendo que no fragmento  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  existem 5 aminoácidos com esta característica e 2 no fragmento  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ . Esta característica pode conduzir ao número reduzido de ligações de hidrogénio intermoleculares entre *backbones*, estando assim o pentâmero estabilizado por ligações de hidrogénio entre cadeias laterais. Para além disto, a capacidade das sequências se enrolarem sobre si próprias deve ser tida em conta, pois a sua interação intramolecular leva a um aumento da estabilização local e por isso há uma inibição das interações intermoleculares, como as ligações de hidrogénio. Comparando com os resultados laboratoriais, podemos pôr a hipótese, dos agregados encontrados laboratorialmente com as soluções a pH 7, apresentarem uma conformação estabilizada por ligações de hidrogénio, com a mesma estabilidade na solução controlo e solução com líquido iónico [Cho][Arg] no caso do fragmento 16-21 do péptido beta amilóide.

Neste estudo foi apenas verificado o número de ligações por pontes de hidrogénio em função do tempo da simulação, não tendo sido estudado a relação com o tempo de vida destas. Para além disso foram apenas calculadas ligações de hidrogénio entre *backbones*, devido à existência de vários estudos que comprovam que a estabilidade de protofilamentos é devida principalmente a interações deste género, junto com as interações hidrofóbicas, em segundo plano, que envolvem as cadeias laterais [12], [39]. Existem no entanto estudos com conclusões divergentes onde se verificou que a formação da folha- $\beta$  característica dos agregados amilóides é formada devido às ligações de hidrogénio entre *backbones*, tal como referido anteriormente, embora a estabilidade da estrutura seja influenciada principalmente



por interações entre cadeias laterais [161]. Assim, o facto de termos estudado apenas as ligações de hidrogénio entre a *backbone* das cadeias pode ocultar as ligações também realizadas entre as cadeias laterais [162], apesar de ter sido realizada uma avaliação de todas as interações com a aproximação MM-PBSA, apresentada no capítulo 3.7.

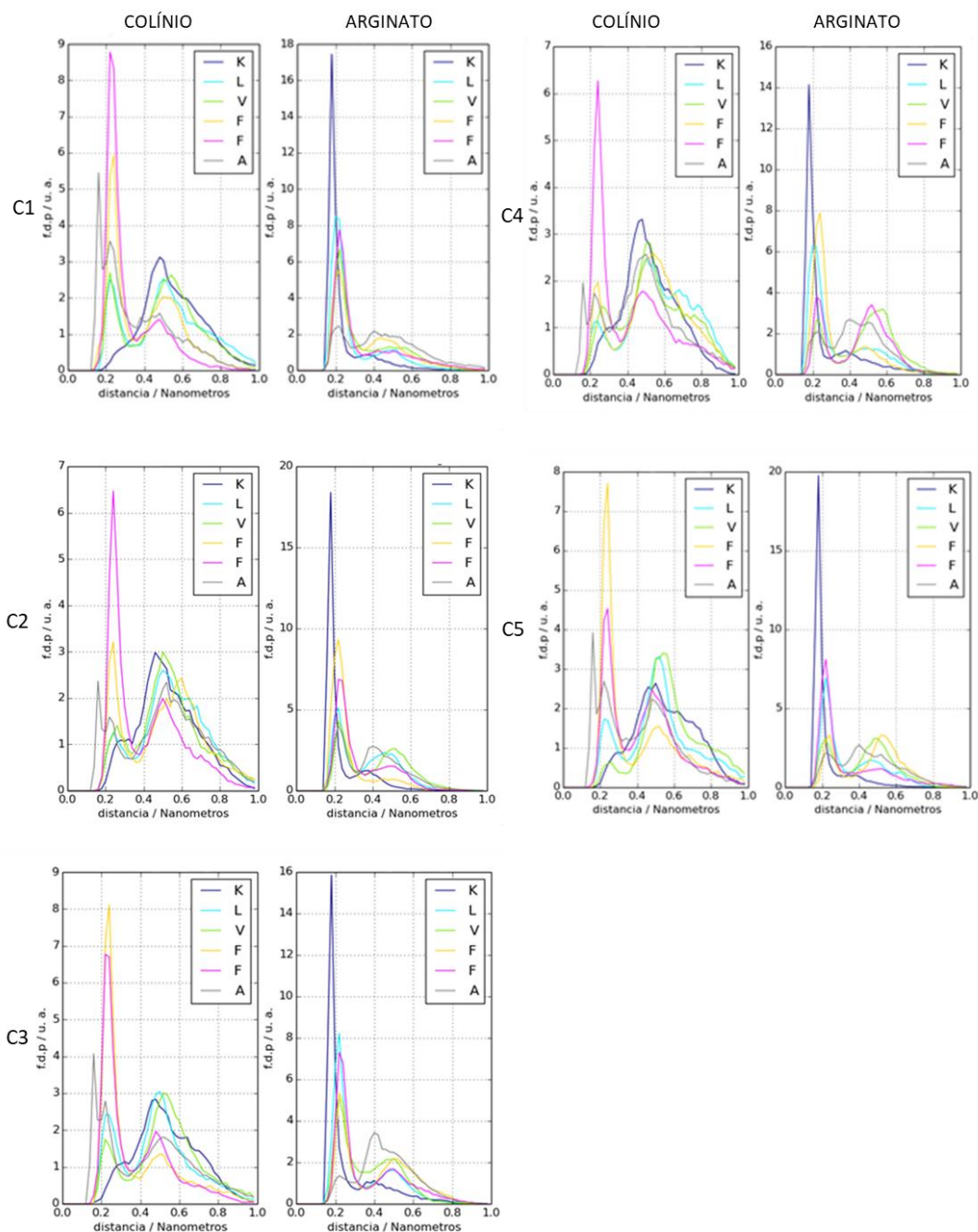
É possível verificar também que para todos os fragmentos em estudo, o número de ligações de hidrogénio não apresenta para a maior parte das cadeias uma variação, quando comparando os sistemas com os dois líquidos iónicos ([Cho][Arg] e [Cho][Tos]). Assim, estudou-se o efeito dos líquidos iónicos nos vários aminoácidos constituintes dos pentâmeros com o objetivo de verificar a existência de interações específicas entre determinados aminoácidos e os componentes de líquido iónico, que podem ser essenciais para a estabilização/destabilização da estrutura inicial usada.

### 3.5 Cálculo da distância mínima entre componentes do líquido iónico e aminoácidos

Com as simulações realizadas com sistemas conjugando os pentâmeros proteicos solvatados com soluções aquosas de líquidos iónicos a 0,5 M ([Cho][Arg] e [Cho][Tos]) foram determinadas as distâncias mínimas entre cada aminoácido (de cada uma das cinco cadeias constituintes do pentâmero) e cada um dos componentes do líquido iónico (anião e catião) para perceber o seu efeito na estabilidade da cadeia. Foram construídas funções de densidade de probabilidade com as distâncias mínimas obtidas, sendo que estas descrevem a probabilidade relativa de um componente do líquido iónico se situar a uma dada distância do aminoácido.

No caso do fragmento da proteína A $\beta$  em estudo, no sistema com o líquido iónico [Cho][Arg] 0,5 M, é verificado que o anião e o catião constituintes apresentam diferenças no seu posicionamento relativo aos aminoácidos, isto porque as topologias das curvas dos gráficos apresentam diferenças no seu comportamento, tal como apresentado na Figura 36. No caso do catião [Cho]<sup>+</sup> e do anião [Arg]<sup>-</sup> é verificado que existem duas distâncias preferenciais, evidenciadas por picos nos gráficos, sendo estas aproximadamente de 0,2 nm e 0,5 nm, apresentando apesar disso a distância de 0,2 nm uma maior probabilidade de ocorrência em relação aos 0,5 nm, embora no caso do anião esta diferença seja mais evidente; para além desta diferença é verificado também que cada um dos constituintes do líquido iónico tem diferentes distâncias mínimas em relação ao mesmo aminoácido da mesma

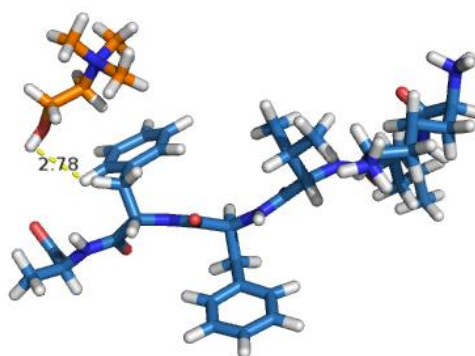
cadeia.



**Figura 36** - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  da proteína A $\beta$  e os componentes do líquido iônico, íons  $[\text{Cho}]^+$  e  $[\text{Arg}]^-$ .

Avaliando os gráficos referentes ao fragmento da A $\beta$  e o catião  $[\text{Cho}]^+$ , é verificado que para todas as cadeias, o catião encontra-se sempre à menor distância dos aminoácidos fenilalanina (F), nomeadamente para três cadeias, uma cadeia terminal, definida como

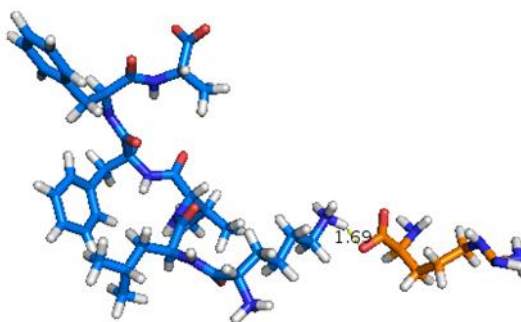
primeira cadeia, e para a segunda e quarta correspondentes. A distância menor é relativa à fenilalanina na posição 5 da sequência enquanto que nas restantes, terceira e a quinta cadeia (terminal), a distância menor é relativa à fenilalanina na posição quatro, o que permite concluir que ambos os aminoácidos fenilalanina localizam-se numa posição bastante próxima deste componente do líquido iónico, exemplo na Figura 37. A fenilalanina é o único aminoácido aromático na sequência deste fragmento, sendo este um possível fator para as reduzidas distâncias em relação ao catião, evidenciando que a sua cadeia lateral com um anel aromático que apresenta características hidrofóbicas pode permitir uma maior aproximação ao ião colínio, de forma a minimizar o seu contacto com a água. Existe, para além da fenilalanina, a alanina (A; não polar), que apresenta, na maioria das cadeias, uma probabilidade superior para a distância de aproximadamente 0,2 nm do que para 0,5 nm, nas cadeias 1, 3 e 5. Todos os restantes aminoácidos, lisina (K), leucina (L) e valina (V) apresentam uma probabilidade superior de estarem a uma distância aproximada de 0,5 nm do colínio, sendo considerados aminoácidos carregado positivamente, e não polares respetivamente.



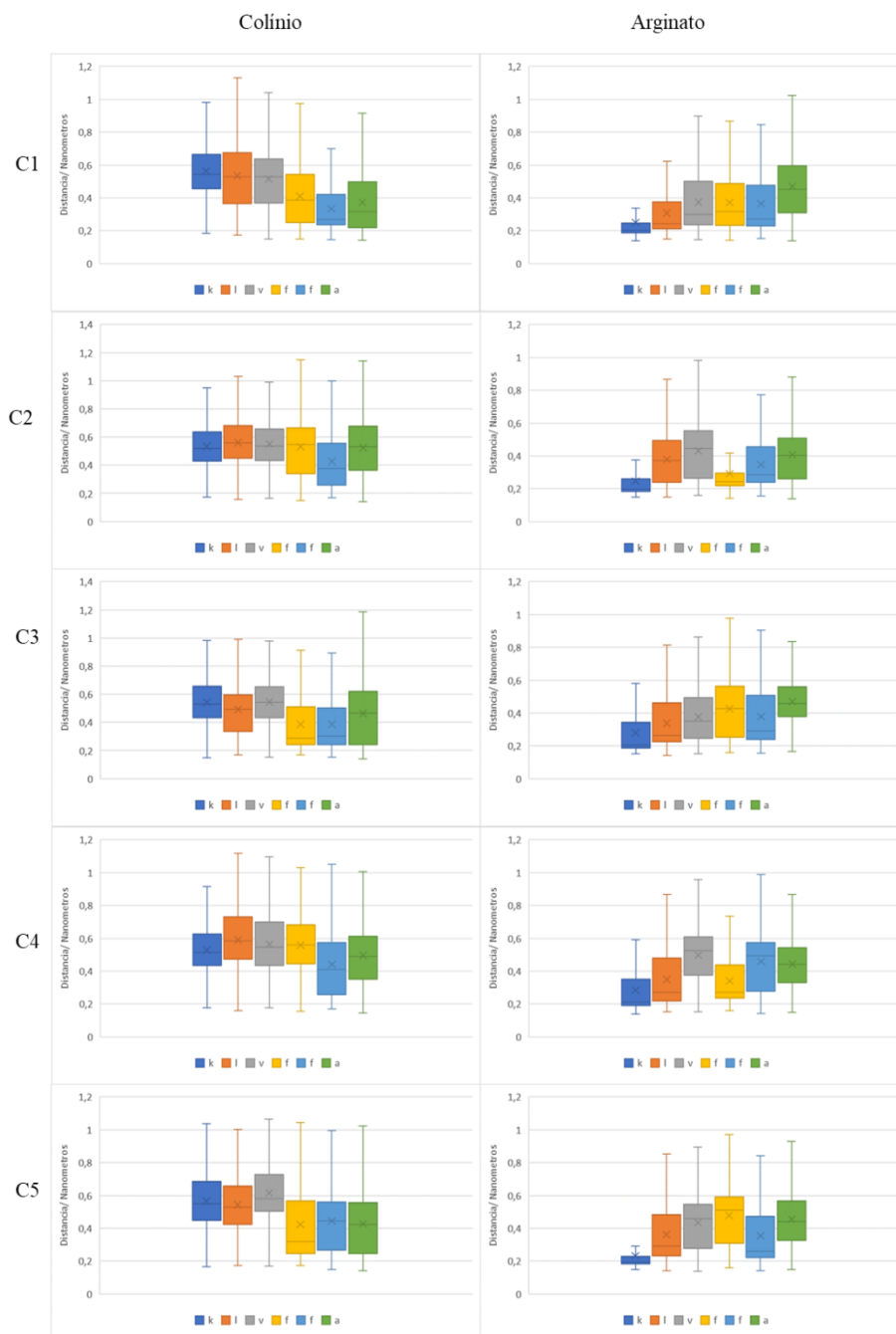
**Figura 37** - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido fenilalanina da quinta posição da sequência <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup> pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a fenilalanina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).

Para o anião arginato é verificado, que para as cinco cadeias, a probabilidade de este anião se encontrar a uma distância de ~0,2 nm do aminoácido lisina é superior do que para os restantes aminoácidos - exemplo na Figura 38. Este aminoácido apresenta carga positiva e por isso a sua maior proximidade em relação ao anião pode ser justificada por atração eletrostática. Todos os outros aminoácidos constituintes apresentam um pico aproximado de

0,2 nm com uma probabilidade superior do que a encontrada para o catião colínio, e também um pico a aproximadamente 0,5 nm tal como para o catião já referido, com a probabilidade de estar a essa distância a ser muito semelhante às encontradas para os respetivos aminoácidos comparando com o catião. Assim, é possível concluir que para o sistema que inclui o líquido iónico constituído [Cho][Arg], o colínio tem maior probabilidade de estar próximo dos aminoácidos fenilalanina, enquanto que o arginato apresenta mais probabilidade de se encontrar mais próximo do aminoácido lisina, sendo também importante a análise das médias e desvios padrões dos resultados obtidos pela dificuldade de leitura direta do gráfico para todos os aminoácidos - Figura 39.



**Figura 38** - Distância em Å, entre o anião arginato (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido lisina da sequência <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup> pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião colínio a laranja e para a lisina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).



**Figura 39** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  e os componentes de líquido iônico, iões colínio e arginato.

As distâncias aproximadas de 0,2 nm evidentes para todos os sistemas em estudo podem ser indicativas de interação ião-aminoácido, entre dois átomos diretamente, embora os picos visualizados a aproximadamente 0,5 nm possam ser indicativos de uma interação

ião-aminoácido a uma distância superior, não interagindo diretamente mas por intermédio de moléculas de água, constituinte maioritário do solvente, que se podem localizar entre as duas moléculas, mas que pode não ser um fator impeditivo para que as interações componente de líquido iónico e aminoácido existam.

Para o segundo sistema com o pentâmero constituído pela sequência <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup> solvatado com [Cho][Tos] 0,5 M, podemos verificar que para o catião [Cho]<sup>+</sup> existem novamente as duas distâncias com picos bem definidos, aproximadamente a 0,2 e a 0,5 nm (ver Anexo C, Figura C. 1). Para o anião [Tos]<sup>-</sup> não é verificado o mesmo comportamento que para o catião, sendo também díspar do anião do sistema anterior, e sendo visível o pico a aproximadamente 0,2 nm. A 0,5 nm, apenas a alanina apresenta um pico definido em todas as cadeias. Avaliando os iões constituintes do líquido iónico individualmente, a probabilidade do ião [Cho]<sup>+</sup> se posicionar perto de fenilalanina é superior aos restantes, estando com uma probabilidade superior a fenilalanina na posição 4 em três cadeias, cadeia 1, 2 e 5 e a fenilalanina da posição 5 nas restantes, tal como no sistema anterior, embora a alanina tenha também um pequeno pico na distância inferior a 0,2 nm (imagem exemplo em Anexo C, Figura C. 2).

Para o caso do [Tos]<sup>-</sup>, e ao contrário do caso do anião [Arg]<sup>-</sup>, não existe nenhuma evidência da existência do anião perto de nenhum aminoácido específico, apresentando para todos os aminoácidos probabilidades elevadas de se situar perto de estes, à exceção da alanina terminal que apresenta um pico diminuído na distância de ~0,2 nm em relação aos outros aminoácidos e é também o único que apresenta em todas cadeias uma probabilidade visível de se situar a aproximadamente 0,5 nm (imagem exemplo da proximidade dos aminoácidos com este componente, em Anexo C, Figura C. 3 e Figura C. 4). Assim, é possível concluir que para o anião [Tos]<sup>-</sup> a aproximação dos aminoácidos não é seletiva apenas pela sua carga, mas provavelmente por todos os restantes (que não a lisina que apresenta carga positiva) apresentarem cadeias laterais hidrofóbicas, podendo assim ter menor contacto com a água.

No caso dos fragmentos da ovalbumina, existe uma variedade superior de tipos de aminoácidos, mas tal como no fragmento da Aβ, existem dois picos na distância aproximada de 0,2 e 0,5 nm, tanto para o catião [Cho]<sup>+</sup> como para o anião [Arg]<sup>-</sup>, embora o pico correspondente à distância ~0,2 nm seja superior para o anião em todas as cadeias do que para o catião, evidenciando uma maior probabilidade de se encontrar mais perto. Na

interação do fragmento de ovalbumina  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  com  $[\text{Cho}]^+$ , é verificado para todas as cadeias que a probabilidade superior de se encontrar a uma distância menor existe para o glutamato (E), em quatro cadeias, respetivamente dois, três, quatro e cinco, enquanto que a tirosina (Y) da posição 10 se encontra numa cadeia, mas encontra-se com uma probabilidade muito próxima, tal como a tirosina da posição 1 - Anexo C, Figura C. 5. No caso do glutamato este é carregado negativamente com características polares, mas apesar disso, é verificado que a sua distância ao catião colínio pode indicar uma interação eletrostática com este - Anexo C, Figura C. 6. Por outro lado, as duas tirosinas que a sequência apresenta mostram também uma probabilidade superior de se situarem a uma distância aproximada de 0,2 nm. Este aminoácido é considerado polar, apresentando um grupo hidroxilo que pode efetuar ligações de hidrogénio ou de *van der Waals* com o solvente, podendo assim ser este o motivo da proximidade com o colínio. O pico a ~0,5 nm é uniforme para todos os aminoácidos, não havendo a evidência de nenhum, sendo a probabilidade de se encontrar um ião  $[\text{Cho}]^+$  a esta distância aproximadamente a mesma para os sistemas anteriores descritos.

No caso do anião  $[\text{Arg}]^-$  é verificado para todas as cadeias que o aminoácido com maior probabilidade de ser encontrado nas redondezas deste anião é a arginina da posição 8 (ver Anexo C, Figura C. 7). Este aminoácido tem carga positiva e pode interagir com o anião, mas a sua complementaridade de estruturas pode ser uma hipótese para a distância ser pequena em comparação com os restantes, tendo já sido verificado para a proteína  $\alpha$ -quemiotripsogenio, que o aminoácido que permanece em maior contacto com o ião da arginina é a arginina tal como verificado no nosso sistema [163]. Para além disso o segundo aminoácido com maior probabilidade de estar a menor distância é a tirosina da posição 1, por observação direta ou por avaliação das distancias médias (ver Anexo C, Figura C. 8).

Para o sistema com o líquido iónico  $[\text{Cho}][\text{Tos}]$ , é verificado tal como em todos os sistemas já referidos anteriormente o destaque dos mesmos dois picos para a distância mínima (ver Anexo C, Figura C. 9). Apesar disso, existem vários aminoácidos com alta probabilidade de estarem a pouca distância do componente  $[\text{Cho}]^+$ , podendo ser evidenciado o glutamato, já referido no sistema anterior para este catião, a fenilalanina, e as tirosinas da posição 1 e 10, apresentada imagem exemplo no Anexo C, Figura C. 10. Para a distância de 0,5 nm, todos os aminoácidos apresentam um pico, similar ao todos os sistemas já referidos, mas em que não há hegemonia de nenhum aminoácido. Para o anião  $[\text{Tos}]^-$ , é novamente

difícil identificar quais são os aminoácidos que se encontram com maior probabilidade a uma menor distância, havendo várias sobreposições. Apesar disso, os que mais se evidenciam por leitura direta do gráfico e por verificação das distâncias mínimas médias são a fenilalanina, a serina da posição 4 e as leucinas das posições 5 e 9 e a arginina, apresentados nos Anexo C, Figuras C. 11 e 12. Por outro lado, é verificado que o pico mais visível na distância de 0,5 nm é para o aminoácido glutamato, podendo isto ser devido às cargas de sinais contrários que têm tendência para se repelirem.

Com a segunda sequência do fragmento da ovalbumina, <sup>173</sup>MVLVNAIVFKG<sup>183</sup>, é possível verificar no sistema com [Cho][Arg] que existem novamente os dois picos, como em todos os sistemas anteriores nas distâncias já referidas (visualizar Anexo C, Figura C. 13). Para o catião colínio na distância ~0,2 nm consegue-se evidenciar que a fenilalanina e a glicina (G) apresentam-se com a maior probabilidade de estarem a esta distância, ambos não polares e a glicina apresentando uma curta cadeia hidrofóbica, tendo a cadeia 4 uma exceção neste comportamento, ver imagem exemplo, Anexo C, Figura C. 14. No caso da distância de ~0,5 nm, é possível evidenciar a lisina com carga positiva, podendo se justificar por repulsão de cargas, e a metionina e valina da posição 1 e 2 respetivamente. No caso do anião [Arg]<sup>-</sup>, é visível a aproximação de fenilalaninas, da metionina da posição 1 e da lisina (ver Anexo C, Figuras C. 15 e 16). Por outro lado, à distância de 0,5 nm a probabilidade de encontrar a glicina perto do componente [Arg]<sup>-</sup> é superior aos restantes aminoácidos.

Para o mesmo fragmento no sistema com [Cho][Tos], são encontrados os mesmos dois picos para a probabilidade de ocorrência de distâncias mínimas de ~0,2 e 0,5 nm, apresentados no Anexo C, Figura C. 17. Para o caso do ião [Cho]<sup>+</sup>, não é possível evidenciar os aminoácidos que se situam mais próximos deste componente do líquido iónico, mas é possível verificar que os aminoácidos que apresentam probabilidade de se encontrarem a uma distância de 0,5 nm são a valina, alanina e a isoleucina (I) (ver Anexo C, Figura C. 18). Para o caso do anião [Tos]<sup>-</sup> é possível verificar que há um pico principal para todos os aminoácidos na distância ~0,2 nm, com uma pequena diminuição da glicina, sendo este o aminoácido que tem um pico aumentado perto dos 0,5 nm, nas cadeias 1,4 e 5 (ver Anexo C, Figuras C. 19 e 20).

Para todos os sistemas foi verificada a seletividade dos componentes do líquido iónico pela proximidade a aminoácidos específicos, como os que apresentavam cargas de sinal contrário preferencialmente, mas o fator para além da carga do aminoácido que permite

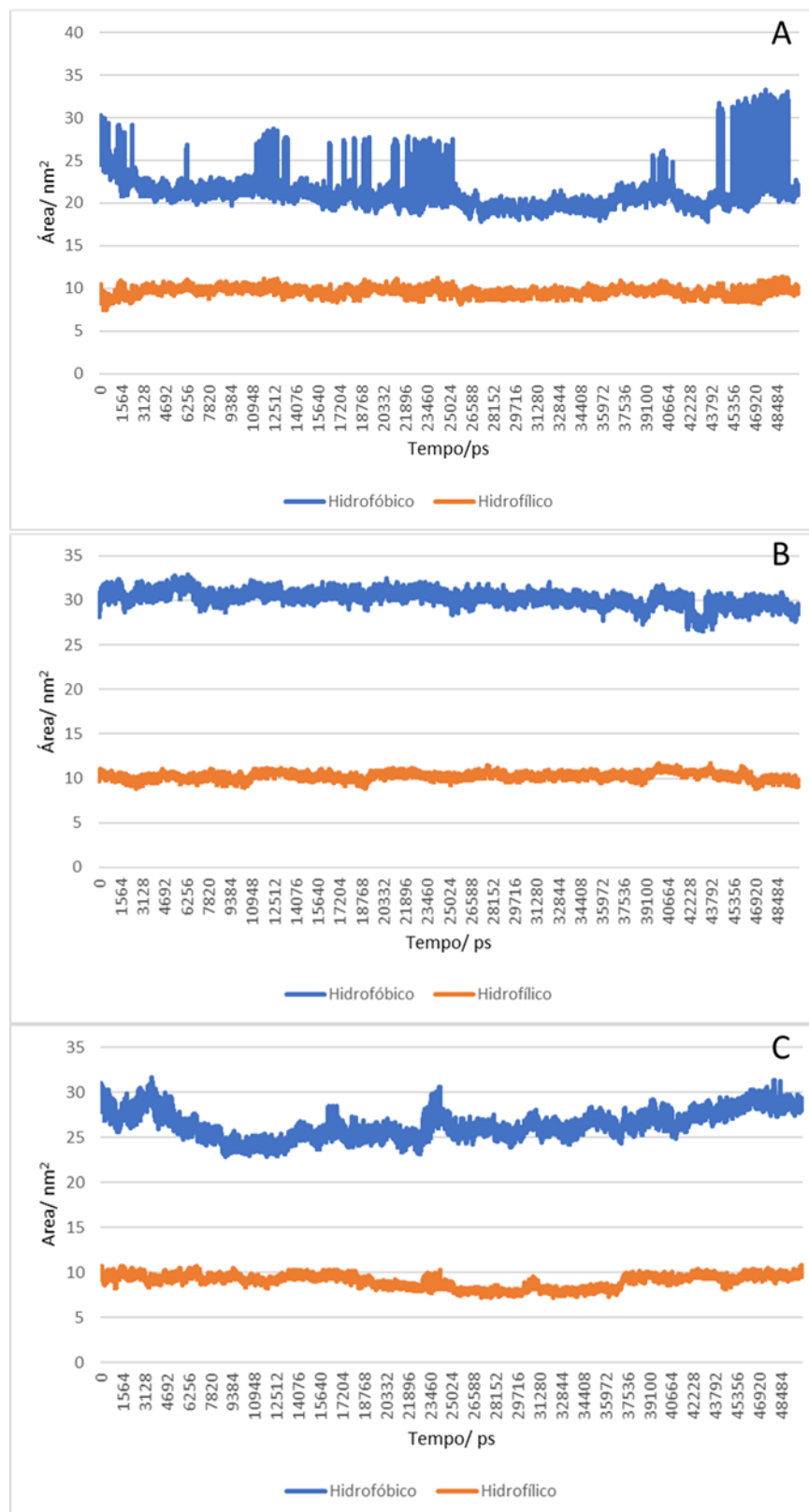


uma menor distância entre componente de líquido iônico e aminoácido, não se encontra bem definido. Por isso, foi verificado se o fator hidrofobicidade dos aminoácidos era o fator seletivo para estas mudanças nas distâncias. Tendo em conta a ordem de hidrofobicidade para os aminoácidos constituintes dos diferentes pentâmeros [164], é possível verificar que a ordem de hidrofobicidade não é o fator determinante para uma distância seletiva entre componente de líquido iônico-aminoácido.

Esta distância apesar de ser seletiva em alguns aspetos, é evidência que existe uma interação componente de líquido-iônico aminoácido envolvendo a maioria dos aminoácidos das cadeias (visível pelo aspeto dos gráficos). Por outro lado, o pico a  $\sim 0,5$  nm, pode ser evidência para a existência de uma esfera de solvatação de água; sendo que com esta hipótese é possível também ter em conta que a interação aminoácido-aminoácido inter-cadeia pode não ser feito diretamente, mas por “mediação” por líquido iônico e água. Como já referido, o mecanismo de formação de fibrilas encontra-se pouco compreendido, e especificando o papel da água neste processo, a informação é também bastante escassa. Para a proteína tau, uma das proteínas também relacionada com a doença do Alzheimer, foi verificado que comparando monómeros da proteína com a fibrila já formada, a esfera de hidratação é mais móvel na superfície desta última, enquanto que por uso de simulações de dinâmica molecular, o uso de fragmentos da proteína tau, como modelos para o domínio do núcleo central das fibrilas, permitiu verificar que a dinâmica da água era bastante reduzida após a formação de fibrilas [165], sendo que a mobilidade das moléculas de água vai favorecer entropicamente o processo. Assim, é possível verificar que a esfera de hidratação, e também a sua mobilidade, afeta a disposição dos líquidos iônicos e modifica o mecanismo de fibrilação e a estabilidade dos agregados formados, sendo o mesmo também visível pelos resultados laboratoriais obtidos, requerendo mais estudos.

### 3.6 SASA (*Solvent accessible surface area*)

A ferramenta SASA (*Solvent accessible surface area*) do *Gromacs* define as áreas hidrofílicas e hidrofóbicas de acordo com a natureza dos aminoácidos, sendo analisada a área de superfície acessível ao solvente num raio de 0,14 nm. Pela análise dos gráficos é possível visualizar que os resíduos hidrofóbicos apresentam uma maior área de superfície acessível ao solvente do que os resíduos hidrofílicos, para todos os sistemas em estudo. Na Figura 40 é possível visualizar os gráficos de SASA referentes aos sistemas para o péptido <sup>16</sup>KLVFFA<sup>21</sup>. No sistema controlo existe uma grande oscilação da SASA para os aminoácidos hidrofóbicos, o que não acontece para os sistemas com líquidos iónicos; para os sistemas com líquidos iónicos a área de solvente acessível mantém-se constante, tanto para os resíduos hidrofóbicos como para os resíduos hidrofílicos. No caso do pentâmero em estudo, todos os aminoácidos inicialmente encontravam-se igualmente expostos aos solventes e os resultados obtidos mostram que os aminoácidos hidrofóbicos apresentam uma área superficial elevada e constante em contacto com o solvente. No caso dos sistemas com líquidos iónicos, não existe uma diferença significativa na área superficial acessível comparando os dois, sendo que a pequena distância dos componentes do líquido iónico aos aminoácidos constituintes do pentâmero, pode favorecer a que a conformação se mantenha constante, contribuindo para a elevada área de superfície acessível.



**Figura 40** - Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , A- sistema controle, B- sistema com o líquido iônico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iônico [Cho][Tos].

No caso do fragmento da ovalbumina  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ , é verificado para o sistema controle que há uma diminuição abrupta da SASA no início da simulação dos aminoácidos hidrofóbicos (ver Anexo D- Figura D. 1), estando a área dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos com uma diferença de área muito pequena, ao contrário do que acontece para o sistema controle do pentâmero com a sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  da proteína A $\beta$  e com o fragmento  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  também da proteína ovalbumina (ver Anexo D- Figura D. 2). Este comportamento díspar pode significar a existência de mudanças conformacionais na estrutura proteica constituída por este fragmento; enquanto que no caso do pentâmero com a sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , o sistema controle apresenta um comportamento constante para as duas áreas, tal como para os sistemas com líquidos iônicos.

Com estes resultados tornou-se relevante avaliar a estrutura secundária dos pentâmeros, que foi realizada com a ferramenta DSSP, e cujos resultados são apresentados em Anexo D - Figuras D. 3-5. Foi possível verificar que para o pentâmero constituído pelo fragmento de ovalbumina  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ , são visíveis estruturas em folha- $\beta$  locais no sistema controle, o que não é visível para os sistemas com líquidos iônicos. Por outro lado, para o pentâmero com o fragmento  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , existem evidências de folhas- $\beta$  locais nos três sistemas, mas constituídas por menor número de aminoácidos comparando com o sistema controle do fragmento anterior descrito. Para o pentâmero do fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  foi verificado que para todos os sistemas existiam também localmente estruturas em folha- $\beta$ .

A diferença entre as áreas acessíveis ao solvente entre aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos está relacionada com a obtenção de agregados com folhas- $\beta$  locais, sendo este fenómeno mais evidente para o pentâmero com a sequência  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ , no sistema controle, em que a diferença entre a SASA de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos é muito diminuída, demonstrando que existiu uma mudança conformacional que permite aumentar a exposição ao solvente dos aminoácidos hidrofílicos e a ocorrência de folhas- $\beta$  locais. Nos sistemas com a sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  e a sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  a estrutura secundária local em folha- $\beta$  por análise dos gráficos de DSSP mantém-se constante ao longo da simulação, tal como os valores de área acessível ao solvente de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Apesar das folhas- $\beta$  locais encontradas nos sistemas, a maior fração dos aminoácidos constituintes de todos os pentâmeros dos sistemas, encontra-se sem uma estrutura secundária definida, havendo assim evidências que

os agregados formados são de natureza amorfa. Note-se que estes agregados são de uma enorme importância para compreender as diferenças entre os mecanismos de formação de agregados do tipo amilóide e amorfo.

Tendo em conta também os dados laboratoriais, é possível verificar que para o fragmento da proteína A $\beta$  foram obtidos agregados morfologicamente amorfos por visualização das imagens microscópicas, tal como nas simulações de dinâmica molecular em meio a pH 7 no sistema controlo, embora o mesmo não se tenha verificado laboratorialmente para as amostras com líquidos iónicos numa concentração de 0,5 M para esta sequência. A formação de agregados amorfos também não foi verificada para a proteína ovalbumina nas soluções com as concentrações de líquido iónico [Cho][Arg] e [Cho][Tos] 0,5 M, nem para a solução controlo laboratorialmente. O estudo laboratorial para estas amostras decorreu apenas durante 3 dias, podendo com o aumento do tempo de estudo ocorrer a formação de agregados nas soluções em que não foram encontrados, devido à cinética da reação envolvida. Assim, as simulações de MD permitem supor que a ocorrência de agregados nestas condições laboratoriais seria possível, mas os agregados teriam morfologia amorfa, com ocorrência localizada de estrutura secundária em folha- $\beta$ .

### 3.7 MM-PBSA (*Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*)

O cálculo da decomposição de energia livre de ligação das cinco cadeias que constituem os pentâmeros dos sistemas em estudo, no controlo e na presença dos dois líquidos iónicos no solvente, foi feito com recurso ao MM-PBSA pela ferramenta *g\_mmpbsa* [166]. O MM-PBSA determina a energia livre absoluta usando três termos energéticos, sendo o primeiro a mudança de energia potencial no vácuo,  $\langle E_{MM} \rangle$ , que inclui as ligações *bonded* e as *nonbonded*, respetivamente, ligações, ângulos, diedros e *nonbonded van der Waals* e interações eletrostáticas, de acordo com a equação 15,

$$E_{MM} = E_{bonded} + (E_{vdW} + E_{elec}) \quad (15)$$

No segundo termo é tido em conta a retirada de solvente das espécies em estudo, sendo quantificado pelo uso de um modelo de solvatação implícito, usando as energias polares e não polares de solvatação, tal como apresentado na equação 16,

$$G_{\text{solvatação}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{não polar}} \quad (16)$$

sendo  $G_{\text{polar}}$  as contribuições eletrostáticas, estimadas pela equação de Poisson–Boltzmann (PB), e  $G_{\text{não polar}}$  as contribuições não eletrostáticas, sendo estas diretamente proporcionais à SASA, sendo dadas pela equação 17,

$$G_{\text{não polar}} = \gamma \text{SASA} + b \quad (17)$$

com  $\gamma$  sendo a constante de proporcionalidade e  $b$  uma constante de correção empírica.

Por último, o terceiro elemento tem em conta a conformação entrópica associada à formação do complexo na fase gasosa, estando os três termos anteriormente referidos representados na equação 18

$$G = \langle E_{MM} \rangle + \langle G_{\text{solvatação}} \rangle - TS_{\text{solute}} \quad (18)$$

sendo  $T$ , a temperatura e  $S$  a entropia do soluto.

Nos sistemas em estudo, a variação da energia livre de ligação das cinco cadeias de peptídeos utilizadas, pode ser dada pela equação 19,

$$\Delta G_{\text{agregação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{C1} + G_{C2} + G_{C3} + G_{C4} + G_{C5}) \quad (19)$$

sendo  $G_{\text{complexo}}$  a energia livre total de das cinco cadeias peptídicas agregadas, e as  $G_{C1}$ - $G_{C5}$ , as energias livres totais das cinco cadeias no solvente apenas constituído por água, ou água e líquido iónico.

A aproximação MM-PBSA é utilizada geralmente em solventes apenas compostos por água, embora possa ser utilizada noutro tipo de solventes, tendo em conta que é necessário ter atenção à adaptação dos parâmetros para estes, com particular atenção para a constante dielétrica, tensão superficial e constante de correção  $b$  (Equação 17). Para o caso do sistema com o solvente apenas composto por água os parâmetros estão totalmente definidos. No entanto, o mesmo não acontece para os sistemas envolvendo líquidos iónicos. Para o cálculo de MM-PBSA nestes solventes podem ser abordadas várias metodologias, e por isso foram utilizadas duas abordagens diferentes para comparação de resultados. O MM-PBSA para os sistemas em estudo foi realizado de 100 em 100 ps, devido ao tempo de cálculo

elevado desta metodologia, com duas abordagens diferentes. Numa abordagem foi alterada para  $20 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ , a constante dielétrica do solvente contendo líquido iônico, tendo como termo de comparação o valor de  $80 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  para a água. Numa segunda abordagem foi alterado o raio dos componentes do líquido iônico e acrescentada a sua concentração no sistema de 0,5 M. Na primeira abordagem, com a alteração da constante dielétrica do solvente, é necessário ter em conta a dificuldade de medir esta propriedade para líquidos iônicos pois apresentam uma condutividade elétrica intrínseca [167].

Avaliando os resultados obtidos na Tabela 8, é possível verificar que existe uma discrepância entre as duas abordagens para o cálculo do MM-PBSA e um elevado desvio padrão na maioria dos sistemas devido às oscilações conformacionais das espécies proteicas em estudo. No caso dos sistemas apenas solvatados com água é possível verificar que para todos os fragmentos existe um favorecimento pela conformação em forma de pentâmero, em desfavorecimento das cadeias separadas. No caso dos sistemas que incluem líquido iônico, o fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  é o único fragmento em que existe, para todos os valores obtidos, um favorecimento do pentâmero em relação às cinco cadeias separadas. No caso dos fragmentos da ovalbumina, tendo em conta o desvio-padrão associado, a energia livre de agregação para estes aparenta estar entre valores favoráveis e desfavoráveis de agregação, e por isso pode não existir uma conformação estável ao longo do tempo da simulação. Estes dados apesar de nos permitirem tirar conclusões acerca da estabilidade das conformações obtidas por MD baseiam-se em duas metodologias que não têm em conta todas as propriedades do sistema e em que foi necessário usar valores estimados devido à complexidade do sistema, como a constante dielétrica do solvente, que podem interferir para a diferença de resultados nas duas metodologias.

Relacionando estes resultados com os obtidos laboratorialmente, é possível concluir que é possível encontrarmos agregados com conformação maioritariamente amorfa com folhas- $\beta$  locais, nas soluções preparadas a pH 7 com o fragmento  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , também para a concentração de 0,5 M de [Cho][Arg] e [Cho][Tos], no entanto seria necessário um aumento do tempo de estudo, para estes poderem ser visíveis por microscopia. No entanto, para a ovalbumina é necessário fazer estudos adicionais, tendo em conta a discrepância de resultados obtidos, não nos permitindo concluir se seria possível encontrar agregados para estas concentrações de líquido iônico com o aumento do tempo de estudo.

**Tabela 8** - Energias livres de ligação médias em kcal/mol com o desvio-padrão associado no final dos 50 ns de simulação, para todos os sistemas em estudo (46 ns para o sistema com o pentâmero do

segundo fragmento de ovalbumina e [Cho][Tos]), utilizando duas abordagens diferentes para o cálculo do MM-PBSA, mudança na constante dielétrica do solvente e alteração no raio e concentração das espécies carregadas.

		Metodologias	
Sistema		Constante dielétrica do solvente	Raio e Concentração
<sup>16</sup> KLVFFA <sup>21</sup>	Controlo	-282,757 ± 59,880	
	[Cho][Arg]	-192,213 ± 39,443	-159,15 ± 98,667
	[Cho][Tos]	-226,829 ± 39,709	-144,759 ± 97,238
<sup>98</sup> YSFSLASRLYAE <sup>109</sup>	Controlo	-253,091 ± 93,480	
	[Cho][Arg]	13,687 ± 71,999	-179,651 ± 223,473
	[Cho][Tos]	-14,339 ± 89,151	-346,047 ± 323,172
<sup>173</sup> MVLVNAIVFKG <sup>183</sup>	Controlo	-109,452 ± 61,833	
	[Cho][Arg]	-90,747 ± 87,555	302,887 ± 74,871
	[Cho][Tos]	-85,376 ± 87,783	351,472 ± 108,175



## 4. Conclusões e trabalho futuro

Tendo em conta a importância do estudo do mecanismo de agregação de proteínas, torna-se pertinente perceber o efeito das condições do meio neste processo. Assim, foi estudado o efeito da inserção de líquidos iônicos, nomeadamente o arginato de colínio e o tosilato de colínio, na conformação proteica. Laboratorialmente, com o uso de um péptido modelo com preponderância para a formação de folhas- $\beta$ ,  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , foi possível verificar que para esta sequência a pH 2 a agregação é favorecida pelos líquidos iônicos, devido à ausência de agregados visíveis no controlo, ao contrário do estudo feito a pH 7 com um tempo mais prolongado para o aparecimento destes para a solução com líquido iónico. No caso da ovalbumina, enquanto que para o estudo a pH 2 foram encontrados agregados fibrilares não amilóides na presença de arginato de colínio e agregados amorfos na presença de tosilato de colínio a 0,05 M, no caso do estudo a pH 7, apenas o [Cho][Tos] favorece a formação de agregados. Por último, para as proteínas totais da clara do ovo a pH 2 não se verificou a formação de nenhum tipo de agregado, o que permitiu concluir que a estrutura primária proteica está relacionada fortemente com o mecanismo de agregação, e não tendo havido nenhum favorecimento da agregação pela presença dos líquidos iônicos. Todos estes resultados permitiram verificar também que o pH é um fator importante para a formação de agregados e para a cinética do mecanismo. A disparidade entre tempos de formação (principalmente no caso das réplicas da amostra com [Cho][Arg] a 0,05 M pH 2) permite concluir que o mecanismo de formação de agregados tanto amorfos como fibrilares encontra-se ainda pouco compreendido. Assim, torna-se relevante estudar no futuro as mesmas amostras (e com concentrações de líquidos iônicos intermédias), mas sob temperatura controlada e com controlo da força iónica e pH das soluções, podendo estes serem fatores determinantes para os resultados dispares obtidos. É também de elevada relevância utilizar técnicas como FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*) e DLS (*Dynamic light scattering*) para se conseguir uma caracterização mais completa dos agregados formados.

Devido aos diferentes efeitos dos líquidos iônicos na agregação de proteínas verificados laboratorialmente, as simulações de dinâmica molecular permitiram verificar, com o uso de fragmentos de proteínas, que existe uma interação dos componentes dos líquidos iônicos com os aminoácidos da proteína. Foi observado que há uma estabilização

inter-cadeia por ligações de hidrogénio que possibilita a estabilização localizada de estruturas em forma de folha- $\beta$ , característica de fibrilas amilóides, mesmo que a estrutura dos agregados seja maioritariamente sem estrutura secundária definida, podendo o mesmo ser verificado com os agregados amorfos que foram encontrados nas amostras estudadas laboratorialmente. A interação dos líquidos iónicos com os aminoácidos constituintes dos fragmentos das proteínas é evidente com as distâncias mínimas encontradas entre eles, garantindo que existe uma função em cada um dos componentes dos líquidos iónicos nas mudanças conformacionais das proteínas. O cálculo do MM-PBSA mostrou que apesar de os valores de energia livre de associação encontrados não permitirem concluir inequivocamente se a conformação em forma de agregado é mais favorável do que a conformação em cadeias separadas, existem variações nos valores obtidos para os diferentes fragmentos nos líquidos iónicos em estudo que precisam de ser estudados para perceber o mecanismo comum ou os vários mecanismos que levam à formação de agregados proteicos nestes solventes. Assim, é importante estudar futuramente com recurso a MD diferentes concentrações de líquidos iónicos para comparação com os resultados obtidos para estas concentrações e com os resultados obtidos laboratorialmente, tal como realizar simulações dos mesmos sistemas a pH 2, junto com MD de maior duração e com amostragens mais representativas.

## 5. Bibliografia

- [1] C. B. Anfinsen, "Studies on the principles that govern the folding of protein chains," *Sci.*, vol. 181, no. 4096, pp. 223–230, 1972.
- [2] F. Chiti and C. M. Dobson, "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, pp. 333–366, 2006.
- [3] F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl, "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 574–581, 2009.
- [4] H. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, and S. Kiese, "Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 9, pp. 2909–2934, 2009.
- [5] W. Wang, S. Nema, and D. Teagarden, "Protein aggregation—Pathways and influencing factors," *Int. J. Pharm.*, vol. 390, no. 2, pp. 89–99, 2010.
- [6] J. R. Alford, B. S. Kendrick, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Measurement of the second osmotic virial coefficient for protein solutions exhibiting monomer–dimer equilibrium," *Anal. Biochem.*, vol. 377, no. 2, pp. 128–133, 2008.
- [7] A. Saluja and D. S. Kalonia, "Nature and consequences of protein–protein interactions in high protein concentration solutions," *Int. J. Pharm.*, vol. 358, no. 1, pp. 1–15, 2008.
- [8] N. Ferguson and A. R. Fersht, "Early events in protein folding," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 75–81, 2003.
- [9] M. E. M. Cromwell, E. Hilario, and F. Jacobson, "Protein aggregation and bioprocessing," *AAPS J.*, vol. 8, no. 3, pp. E572–E579, 2006.
- [10] N. K. Holm *et al.*, "Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics*, vol. 1774, no. 9, pp. 1128–1138, 2007.
- [11] Z. Shahrokh, V. Sluzky, P. R. Stratton, G. A. Eberlein, and Y. J. Wang, "Disulfide-Linked Oligomerization of Basic Fibroblast Growth Factor. Effect of Sulfated Compounds.," *ChemInform*, vol. 26, no. 4, 1995.
- [12] C. M. Dobson, "Protein misfolding, evolution and disease," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, no. 9, pp. 329–332, 1999.
- [13] D. J. Selkoe, "Folding proteins in fatal ways," *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 900–904, 2003.
- [14] C. A. Ross and M. A. Poirier, "Protein aggregation and neurodegenerative disease," *Nat.*, vol. 10, pp. 10–17, 2004.
- [15] F. G. Pearce, S. H. Mackintosh, and J. A. Gerrard, "Formation of amyloid-like fibrils by ovalbumin and related proteins under conditions relevant to food processing," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 318–322, 2007.
- [16] I. Cherny and E. Gazit, "Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 47, no. 22, pp. 4062–4069, 2008.
- [17] T. P. J. Knowles and M. J. Buehler, "Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 8, pp. 469–479, 2011.

- [18] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, and S. L. Lindquist, "Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 8, pp. 4527–4532, 2003.
- [19] A. Aggeli *et al.*, "pH as a trigger of peptide  $\beta$ -sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 32, pp. 9619–9628, 2003.
- [20] C. Li, A. Born, T. Schweizer, M. Zenobi-Wong, M. Cerruti, and R. Mezzenga, "Amyloid-Hydroxyapatite Bone Biomimetic Composites," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 20, pp. 3207–3212, 2014.
- [21] M. Malisauskas, R. Meskys, and L. A. Morozova-Roche, "Ultrathin silver nanowires produced by amyloid biotemplating," *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 5, pp. 1166–1170, 2008.
- [22] R. S. Jacob *et al.*, "Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation," *Biomaterials*, vol. 54, pp. 97–105, 2015.
- [23] A. T. Petkova *et al.*, "A structural model for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 26, pp. 16742–16747, 2002.
- [24] L. C. Serpell, M. Sunde, M. D. Benson, G. A. Tennent, M. B. Pepys, and P. E. Fraser, "The protofilament substructure of amyloid fibrils," *J. Mol. Biol.*, vol. 300, no. 5, pp. 1033–1039, 2000.
- [25] L. C. Serpell, "Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.*, vol. 1502, no. 1, pp. 16–30, 2000.
- [26] R. Tycko, "Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 96–103, 2004.
- [27] C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, and R. G. Griffin, "High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 3, pp. 711–716, 2004.
- [28] A. E. Langkilde, K. L. Morris, L. C. Serpell, D. I. Svergun, and B. Vestergaard, "The architecture of amyloid-like peptide fibrils revealed by X-ray scattering, diffraction and electron microscopy," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 71, no. 4, pp. 882–895, 2015.
- [29] P. Picotti *et al.*, "Amyloid fibril formation and disaggregation of fragment 1-29 of apomyoglobin: insights into the effect of pH on protein fibrillogenesis," *J. Mol. Biol.*, vol. 367, no. 5, pp. 1237–1245, 2007.
- [30] S. K. Chaturvedi, M. K. Siddiqi, P. Alam, and R. H. Khan, "Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection," *Process Biochem.*, vol. 51, no. 9, pp. 1183–1192, 2016.
- [31] J. D. Harper and P. T. Lansbury Jr, "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, no. 1, pp. 385–407, 1997.
- [32] J. H. Viles, "Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no. 19, pp. 2271–2284, 2012.
- [33] J. M. Andrews, W. F. Weiss IV, and C. J. Roberts, "Nucleation, growth, and activation energies for seeded and unseeded aggregation of  $\alpha$ -chymotrypsinogen A," *Biochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 2397–2403, 2008.
- [34] A. D. Williams, S. Shivaprasad, and R. Wetzel, "Alanine scanning mutagenesis of A $\beta$  (1-40) amyloid fibril stability," *J. Mol. Biol.*, vol. 357, no. 4, pp. 1283–1294, 2006.

- [35] R. S. Harrison, P. C. Sharpe, Y. Singh, and D. P. Fairlie, "Amyloid peptides and proteins in review," in *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, Springer, pp. 1–77, 2007.
- [36] E. Gazit, "A possible role for  $\pi$ -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils," *FASEB J.*, vol. 16, no. 1, pp. 77–83, 2002.
- [37] J. P. Schmittschmitt and J. M. Scholtz, "The role of protein stability, solubility, and net charge in amyloid fibril formation," *Protein Sci.*, vol. 12, no. 10, pp. 2374–2378, 2003.
- [38] M. Balbirnie, R. Grothe, and D. S. Eisenberg, "An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated  $\beta$ -sheet structure for amyloid," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 2375–2380, 2001.
- [39] F. Chiti *et al.*, "Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 7, pp. 3590–3594, 1999.
- [40] C. Tanford, "Protein Denaturation: Part C. Theoretical Models for The Mechanism of Denaturation," *Adv. Protein Chem.*, vol. 24, pp. 1–95, 1970.
- [41] M. Sugiyama *et al.*, "SAXS and SANS Observations of Abnormal Aggregation of Human  $\alpha$ -Crystallin," *Chem. Biodivers.*, vol. 7, no. 6, pp. 1380–1388, 2010.
- [42] Y. Yoshimura *et al.*, "Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 36, pp. 14446–14451, 2012.
- [43] D. A. Kirschner, C. Abraham, and D. J. Selkoe, "X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 83, no. 2, pp. 503–507, 1986.
- [44] G. G. Glenner, D. L. Page, and E. D. Eanes, "The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the  $\beta$ -conformation," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 20, no. 10, pp. 821–826, 1972.
- [45] I. Benilova, E. Karran, and B. De Strooper, "The toxic A [beta] oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 3, p. 349, 2012.
- [46] S. Lesné *et al.*, "A specific amyloid-[beta] protein assembly in the brain impairs memory," *Nature*, vol. 440, no. 7082, p. 352, 2006.
- [47] C. Soto, M. C. Brañes, J. Alvarez, and N. C. Inestrosa, "Structural Determinants of the Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide," *J. Neurochem.*, vol. 63, no. 4, pp. 1191–1198, 1994.
- [48] I. A. Mastrangelo *et al.*, "High-resolution atomic force microscopy of soluble A $\beta$ 42 oligomers," *J. Mol. Biol.*, vol. 358, no. 1, pp. 106–119, 2006.
- [49] L. O. Tjernberg *et al.*, "Arrest of-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 15, pp. 8545–8548, 1996.
- [50] J. J. Balbach *et al.*, "Amyloid fibril formation by A $\beta$ 16–22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR," *Biochemistry*, vol. 39, no. 45, pp. 13748–13759, 2000.
- [51] R. C. Elgersma, L. M. J. Kroon-Batenburg, G. Posthuma, J. D. Meeldijk, D. T. S. Rijkers, and R. M. J. Liskamp, "pH-controlled aggregation polymorphism of amyloidogenic A $\beta$  (16–22): Insights for obtaining peptide tapes and peptide nanotubes, as function of the N-terminal capping moiety," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 88, pp. 55–65, 2014.
- [52] L. Niu *et al.*, "Transformation of  $\beta$ -sheet structures of the amyloid peptide induced by molecular

- modulators,” *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 64, pp. 8923–8926, 2014.
- [53] Y. Qiao, M. Zhang, Y. Liang, J. Zheng, and G. Liang, “A computational study of self-assembled hexapeptide inhibitors against amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) aggregation,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 1, pp. 155–166, 2017.
  - [54] H. Inouye, K. A. Gleason, D. Zhang, S. M. Decatur, and D. A. Kirschner, “Differential effects of phe19 and phe20 on fibril formation by amyloidogenic peptide A $\beta$ 16–22 (Ac-KLVFFAE-NH<sub>2</sub>),” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 10, pp. 2306–2321, 2010.
  - [55] K. Mann, “The chicken egg white proteome,” *Proteomics*, vol. 7, no. 19, pp. 3558–3568, 2007.
  - [56] Y. Mine, “Recent advances in the understanding of egg white protein functionality,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 7, pp. 225–232, 1995.
  - [57] L. Campbell, V. Raikos, and S. R. Euston, “Modification of functional properties of egg-white proteins,” *Food/Nahrung*, vol. 47, no. 6, pp. 369–376, 2003.
  - [58] A. Pellegrini, A. J. Hülsmeier, P. Hunziker, and U. Thomas, “Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.*, vol. 1672, no. 2, pp. 76–85, 2004.
  - [59] P. W. Gossett, S. S. H. Rizvi, and R. C. Baker, “Quantitative analysis of gelation in egg protein systems,” *Food Technol.*, vol. 38, no. 5, pp. 67–96, 1984.
  - [60] T. M. Johnson and M. E. Zabik, “Gelation properties of albumen proteins, singly and in combination,” *Poult. Sci.*, vol. 60, no. 9, pp. 2071–2083, 1981.
  - [61] A. D. Nisbet, R. H. Saundry, A. J. G. Moir, L. A. Fothergill, and J. E. Fothergill, “The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 115, no. 2, pp. 335–345, 1981.
  - [62] J. A. Huntington and P. E. Stein, “Structure and properties of ovalbumin,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 756, no. 1, pp. 189–198, 2001.
  - [63] D. S. Katz and D. W. Christianson, “Structural aspects of the serpin reaction coordinate,” *Perspect. drug Discov. Des.*, vol. 2, no. 3, pp. 459–474, 1995.
  - [64] Y. Kawachi, R. Kameyama, A. Handa, N. Takahashi, and N. Tanaka, “Role of the N-terminal amphiphilic region of ovalbumin during heat-induced aggregation and gelation,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 36, pp. 8668–8675, 2013.
  - [65] N. Tanaka *et al.*, “The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 7, pp. 5884–5894, 2011.
  - [66] M. Onda, K. Nakatani, S. Takehara, M. Nishiyama, N. Takahashi, and M. Hirose, “Cleaved serpin refolds into the relaxed state via a stressed conformer,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 25, pp. 17568–17578, 2008.
  - [67] H. Azakami, A. Mukai, and A. Kato, “Role of amyloid type cross  $\beta$ -structure in the formation of soluble aggregate and gel in heat-induced ovalbumin,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 4, pp. 1254–1257, 2005.
  - [68] C. Lara, S. Gourdin-Bertin, J. Adamcik, S. Bolisetty, and R. Mezzenga, “Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils,” *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 12, pp. 4213–4221, 2012.
  - [69] M. G. Freire *et al.*, “Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 14, pp. 4966–4995, 2012.

- [70] P. Wasserscheid and W. Keim, "Ionic liquids—new 'solutions' for transition metal catalysis," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 39, no. 21, pp. 3772–3789, 2000.
- [71] R. Hayes, G. G. Warr, and R. Atkin, "Structure and nanostructure in ionic liquids," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 13, pp. 6357–6426, 2015.
- [72] N. V. Plechkova and K. R. Seddon, "Applications of ionic liquids in the chemical industry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 1, pp. 123–150, 2008.
- [73] K. Fujita, D. R. MacFarlane, and M. Forsyth, "Protein solubilising and stabilising ionic liquids," *Chem. Commun.*, no. 38, pp. 4804–4806, 2005.
- [74] S. Dreyer and U. Kragl, "Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 99, no. 6, pp. 1416–1424, 2008.
- [75] N. Byrne, L.-M. Wang, J.-P. Belieres, and C. A. Angell, "Reversible folding–unfolding, aggregation protection, and multi-year stabilization, in high concentration protein solutions, using ionic liquids," *Chem. Commun.*, no. 26, pp. 2714–2716, 2007.
- [76] N. Byrne and C. A. Angell, "Protein unfolding, and the 'tuning in' of reversible intermediate states, in protic ionic liquid media," *J. Mol. Biol.*, vol. 378, no. 3, pp. 707–714, 2008.
- [77] D. Constatinescu, C. Herrmann, and H. Weingärtner, "Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 8, pp. 1756–1763, 2010.
- [78] N. Byrne and C. A. Angell, "Formation and dissolution of hen egg white lysozyme amyloid fibrils in protic ionic liquids," *Chem. Commun.*, no. 9, pp. 1046–1048, 2009.
- [79] H. R. Kalhor, M. Kamizi, J. Akbari, and A. Heydari, "Inhibition of amyloid formation by ionic liquids: ionic liquids affecting intermediate oligomers," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 9, pp. 2468–2475, 2009.
- [80] H. Hwang, H. Choi, H. Kim, and T. D. Kim, "Ionic liquids promote amyloid formation from  $\alpha$ -synuclein," *Anal. Biochem.*, vol. 386, no. 2, pp. 293–295, 2009.
- [81] N. Debeljuh, C. J. Barrow, and N. Byrne, "The impact of ionic liquids on amyloid fibrilization of A $\beta$ 16-22: tuning the rate of fibrilization using a reverse Hofmeister strategy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 37, pp. 16534–16536, 2011.
- [82] B. Pankaj *et al.*, "Incipient and Growth of Functional Protein Fibrils from Egg white Proteome: Effect of Protein Crowding," *R. Soc. Chem.*, 2017 (em preparação).
- [83] H.-J. Tung and J. Pfaendtner, "Kinetics and mechanism of ionic-liquid induced protein unfolding: application to the model protein HP35," *Mol. Syst. Des. Eng.*, vol. 1, no. 4, 2016.
- [84] N. Galamba, "Mapping structural perturbations of water in ionic solutions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 17, pp. 5242–5250, 2012.
- [85] S. Finet, F. Skouri-Panet, M. Casselyn, F. Bonnete, and A. Tardieu, "The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 112–116, 2004.
- [86] A. M. Figueiredo, J. Sardinha, G. R. Moore, and E. J. Cabrita, "Protein destabilisation in ionic liquids: the role of preferential interactions in denaturation," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 45, pp. 19632–19643, 2013.
- [87] H. Weingärtner, C. Cabrele, and C. Herrmann, "How ionic liquids can help to stabilize native proteins," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 2, pp. 415–426, 2012.

- [88] M. Karplus and J. Kuriyan, "Molecular dynamics and protein function," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 19, pp. 6679–6685, 2005.
- [89] J. A. McCammon, B. R. Gelin, and M. Karplus, "Dynamics of folded proteins," *Nat.*, vol. 267, pp. 585–590, 1977.
- [90] W. F. Van Gunsteren and M. Karplus, "Effect of constraints, solvent and crystal environment on protein dynamics," *Nat.*, vol. 293, pp. 677–678, 1981.
- [91] M. Levitt and R. Sharon, "Accurate simulation of protein dynamics in solution," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, no. 20, pp. 7557–7561, 1988.
- [92] A. D. Mackerell, "Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1584–1604, 2004.
- [93] D. J. Price and C. L. Brooks, "Modern protein force fields behave comparably in molecular dynamics simulations," *J. Comput. Chem.*, vol. 23, no. 11, pp. 1045–1057, 2002.
- [94] T. A. Soares, X. Daura, C. Oostenbrink, L. J. Smith, and W. F. Van Gunsteren, "Validation of the GROMOS force-field parameter set 45A3 against nuclear magnetic resonance data of hen egg lysozyme," *J. Biomol. NMR*, vol. 30, no. 4, pp. 407–422, 2004.
- [95] D. K. Klimov and D. Thirumalai, "Dissecting the assembly of A $\beta$  16–22 amyloid peptides into antiparallel  $\beta$  sheets," *Structure*, vol. 11, no. 3, pp. 295–307, 2003.
- [96] D. Matthes, V. Gapsys, and B. L. de Groot, "Driving forces and structural determinants of steric zipper peptide oligomer formation elucidated by atomistic simulations," *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 2, pp. 390–416, 2012.
- [97] A. Srivastava and P. V Balaji, "Molecular events during the early stages of aggregation of GNNQQNY: An all atom MD simulation study of randomly dispersed peptides," *J. Struct. Biol.*, vol. 192, no. 3, pp. 376–391, 2015.
- [98] T. Köddermann, D. Paschek, and R. Ludwig, "Molecular dynamic simulations of ionic liquids: A reliable description of structure, thermodynamics and dynamics," *ChemPhysChem*, vol. 8, no. 17, pp. 2464–2470, 2007.
- [99] B. L. Bhargava and S. Balasubramanian, "Dynamics in a room-temperature ionic liquid: A computer simulation study of 1, 3-dimethylimidazolium chloride," *J. Chem. Phys.*, vol. 123, no. 14, p. 144-505, 2005.
- [100] J. N. A. Canongia Lopes and A. A. H. Pádua, "Using spectroscopic data on imidazolium cation conformations to test a molecular force field for ionic liquids," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7485–7489, 2006.
- [101] C. G. Hanke, S. L. Price, and R. M. Lynden-Bell, "Intermolecular potentials for simulations of liquid imidazolium salts," *Mol. Phys.*, vol. 99, no. 10, pp. 801–809, 2001.
- [102] C. G. Hanke, N. A. Atamas, and R. M. Lynden-Bell, "Solvation of small molecules in imidazolium ionic liquids: a simulation study," *Green Chem.*, vol. 4, no. 2, pp. 107–111, 2002.
- [103] R. M. Lynden-Bell, N. A. Atamas, A. Vasilyuk, and C. G. Hanke, "Chemical potentials of water and organic solutes in imidazolium ionic liquids: a simulation study," *Mol. Phys.*, vol. 100, no. 20, pp. 3225–3229, 2002.
- [104] A. Chaumont and G. Wipff, "Solvation of M<sup>3+</sup> lanthanide cations in room-temperature ionic liquids. A molecular dynamics investigation," *Phys. Chem.*, vol. 5, no. 16, pp. 3481–3488, 2003.



- [105] "Scopus." [Online]. Available: [www.scopus.com](http://www.scopus.com). [Accessed: 12-Jun-2017].
- [106] R. Petrenko and J. Meller, *Molecular dynamics*. New York: Wiley Online Library, 2010.
- [107] A. Hinchliffe, *Molecular Modelling for Beginners*, 1st ed. Manchester: John Wiley & Sons, 2003.
- [108] S. A. Adcock and J. A. McCammon, "Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins," *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 5, pp. 1589–1615, 2006.
- [109] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen, "Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 29, no. 9, pp. 992–1023, 1990.
- [110] W. F. Van Gunsteren *et al.*, "Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 45, no. 25, pp. 4064–4092, 2006.
- [111] M. P. Allen, "Introduction to molecular dynamics simulation," in *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, vol. 23, 2004, pp. 1–28.
- [112] H. Alonso, A. A. Bliznyuk, and J. E. Gready, "Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design," *Med. Res. Rev.*, vol. 26, no. 5, pp. 531–568, 2006.
- [113] D. C. Young, "Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems," 2001.
- [114] M. Karplus and G. A. Petsko, "Molecular dynamics simulations in biology," *Nature*, vol. 347, no. 6294, pp. 631–639, 1990.
- [115] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin, and J. M. Martínez, "PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 13, pp. 2157–2164, 2009.
- [116] D. van der Spoel, P. J. van Maaren, and C. Caleman, "GROMACS molecule & liquid database," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 5, pp. 752–753, 2012.
- [117] O. M. Becker, A. D. MacKerell Jr, B. Roux, and M. Watanabe, *Computational biochemistry and biophysics*. CRC Press, 2001.
- [118] M. J. Field, P. A. Bash, and M. Karplus, "A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations," *J. Comput. Chem.*, vol. 11, no. 6, pp. 700–733, 1990.
- [119] D. Frenkel and B. Smit, "Understanding molecular simulation: from algorithms to applications," *Comput. Sci. Ser.*, vol. 1, pp. 1–638, 2002.
- [120] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*. Pearson education, 2001.
- [121] J. Mathews and R. L. Walker, *Mathematical methods of physics*, 2nd ed., vol. 501. California: WA Benjamin New York, 1970.
- [122] M. R. Hestenes and E. Stiefel, "Methods of conjugate gradients for solving linear systems," *J Res. Nat Bur. Stand.*, vol. 49, no. 6, pp. 409–436, 1952.
- [123] W. C. Swope, J. W. Pitera, and F. Suits, "Describing protein folding kinetics by molecular dynamics simulations. 1. Theory," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 21, pp. 6571–6581, 2004.
- [124] D. C. Rapaport, *The art of molecular dynamics simulation*. Cambridge university press, 2004.

- [125] K. Huang, *Statistical Mechanics*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- [126] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, 2nd ed. Odense: Wiley, 2007.
- [127] M. P. Allen and D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*. Oxford university press, 1989.
- [128] C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, and W. F. Van Gunsteren, "A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1656–1676, 2004.
- [129] J. D. Durrant and J. A. McCammon, "Molecular dynamics simulations and drug discovery," *BMC Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 71, 2011.
- [130] M. Levitt, "The birth of computational structural biology," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 392–393, 2001.
- [131] M. Griebel, S. Knapek, and G. Zumbusch, *Numerical simulation in molecular dynamics: numerics, algorithms, parallelization, applications*, vol. 5. Springer Science & Business Media, 2007.
- [132] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, "Molecular dynamics with coupling to an external bath," *J. Chem. Phys.*, vol. 81, no. 8, 1984.
- [133] M. J. Abraham, D. Van Der Spoel, E. Lindahl, and B. Hess, "GROMACS development team. GROMACS User Manual version 5.0." 2014.
- [134] M. Parrinello and A. Rahman, "Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method," *J. Appl. Phys.*, vol. 52, no. 12, 1981.
- [135] C. Schäfer, H. M. Urbassek, L. V Zhigilei, and B. J. Garrison, "Pressure-transmitting boundary conditions for molecular-dynamics simulations," *Comput. Mater. Sci.*, vol. 24, no. 4, pp. 421–429, 2002.
- [136] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 12, pp. 10089–10092, 1993.
- [137] C. Mukesh, D. Mondal, M. Sharma, and K. Prasad, "Rapid dissolution of DNA in a novel bio-based ionic liquid with long-term structural and chemical stability: successful recycling of the ionic liquid for reuse in the process," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 61, pp. 6849–6851, 2013.
- [138] I. Walsh, F. Seno, S. C. E. Tosatto, and A. Trovato, "PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 301–307, 2014.
- [139] K. Lindorff-Larsen *et al.*, "Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 8, pp. 1950–1958, 2010.
- [140] S. Aparicio, R. Alcalde, B. Garcia, and J. M. Leal, "High-pressure study of the methylsulfate and tosylate imidazolium ionic liquids," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 16, pp. 5593–5606, 2009.
- [141] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *J Comput Chem*, vol. 25, 2004.
- [142] M. Campetella *et al.*, "Interaction and dynamics of ionic liquids based on choline and amino acid anions," *J. Chem. Phys.*, vol. 142, no. 23, p. 234-502, 2015.
- [143] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, and P. A. Kollman, "A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 40, pp. 10269–10280, 1993.

- [144] T. O. Omosun *et al.*, “Catalytic diversity in self-propagating peptide assemblies,” *Nat. Chem.*, vol. 9, 2017.
- [145] K. Tao *et al.*, “Self-assembly of short A $\beta$  (16–22) peptides: Effect of terminal capping and the role of electrostatic interaction,” *Langmuir*, vol. 27, no. 6, pp. 2723–2730, 2011.
- [146] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, “GROMACS: fast, flexible, and free,” *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, 2005.
- [147] A. Tiiman, J. Krishtal, P. Palumaa, and V. Tõugu, “In vitro fibrillization of Alzheimer’s amyloid- $\beta$  peptide (1–42),” *AIP Adv.*, vol. 5, no. 9, p. 92401, 2015.
- [148] H. Abe, K. Kawasaki, and H. Nakanishi, “pH-Dependent Aggregate Forms and Conformation of Alzheimer Amyloid  $\beta$ -Peptide (12–24),” *J. Biochem.*, vol. 132, no. 6, pp. 863–874, 2002.
- [149] K. Klement, K. Wieligmann, J. Meinhardt, P. Hortschansky, W. Richter, and M. Fändrich, “Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer’s A $\beta$  (1–40) amyloid fibrils,” *J. Mol. Biol.*, vol. 373, no. 5, pp. 1321–1333, 2007.
- [150] K. Suzuki, T. Miura, and H. Takeuchi, “Inhibitory effect of copper (II) on zinc (II)-induced aggregation of amyloid  $\beta$ -peptide,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 285, no. 4, pp. 991–996, 2001.
- [151] O. V Bocharova, L. Breydo, V. V Salnikov, and I. V Baskakov, “Copper (II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 18, pp. 6776–6787, 2005.
- [152] F. Rousseau, J. Schymkowitz, and L. Serrano, “Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds?,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 118–126, 2006.
- [153] T. P. J. Knowles *et al.*, “Kinetics and thermodynamics of amyloid formation from direct measurements of fluctuations in fibril mass,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 24, pp. 10016–10021, 2007.
- [154] E. Gasteiger *et al.*, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer, 2005.
- [155] M. Weijers, L. M. C. Sagis, C. Veerman, B. Sperber, and E. Van Der Linden, “Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength,” *Food Hydrocoll.*, vol. 16, no. 3, pp. 269–276, 2002.
- [156] C. Bon, T. Nicolai, and D. Durand, “Growth and structure of aggregates of heat-denatured  $\beta$ -Lactoglobulin,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 34, no. 5–6, pp. 451–465, 1999.
- [157] M. Pouzot, T. Nicolai, R. W. Visschers, and M. Weijers, “X-ray and light scattering study of the structure of large protein aggregates at neutral pH,” *Food Hydrocoll.*, vol. 19, no. 2, pp. 231–238, 2005.
- [158] M. Biancalana and S. Koide, “Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 7, pp. 1405–1412, 2010.
- [159] W. Hoyer, T. Antony, D. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin, and V. Subramaniam, “Dependence of  $\alpha$ -synuclein aggregate morphology on solution conditions,” *J. Mol. Biol.*, vol. 322, no. 2, pp. 383–393, 2002.
- [160] T. Antony, W. Hoyer, D. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin, and V. Subramaniam, “Cellular polyamines promote the aggregation of  $\alpha$ -synuclein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 5, pp. 3235–3240, 2003.
- [161] D. Eisenberg and M. Jucker, “The amyloid state of proteins in human diseases,” *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1188–1203, 2012.
- [162] A. T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, R. D. Leapman, W.-M. Yau, and R. Tycko, “Solid state NMR

- reveals a pH-dependent antiparallel  $\beta$ -sheet registry in fibrils formed by a  $\beta$ -amyloid peptide,” *J. Mol. Biol.*, vol. 335, no. 1, pp. 247–260, 2004.
- [163] D. Shukla and B. L. Trout, “Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 42, pp. 13426–13438, 2010.
  - [164] S. D. Black and D. R. Mould, “Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post-or cotranslational modifications,” *Anal. Biochem.*, vol. 193, no. 1, pp. 72–82, 1991.
  - [165] Y. Fichou *et al.*, “Hydration water mobility is enhanced around tau amyloid fibers,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 20, pp. 6365–6370, 2015.
  - [166] R. Kumari, R. Kumar, O. S. D. D. Consortium, and A. Lynn, “g\_mmpbsa: A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 7, pp. 1951–1962, 2014.
  - [167] T. Singh and A. Kumar, “Static dielectric constant of room temperature ionic liquids: internal pressure and cohesive energy density approach,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 41, pp. 12968–12972, 2008.

## Anexos

### Anexo A

**Tabela A. 1** - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05 e 0,5 M de [Cho][Arg] e 0,5 M de [Cho][Tos] nos sistemas com o fragmento de A $\beta$ 16-21 e água pH 2/PBS, com uma incerteza associada de  $\pm 0,05$  mg.

	Solução stock do fragmento peptídeo de A $\beta$ / mg	Líquido iónico / mg	Água pH=2/ PBS / mg
Controlo	250,00	0,00	250,00
0,05 M [Cho][Arg]	250,00	7,00	243,00
0,5 M [Cho][Arg]	250,00	67,00	183,00
0,5 M [Cho][Tos]	250,00	69,00	181,00

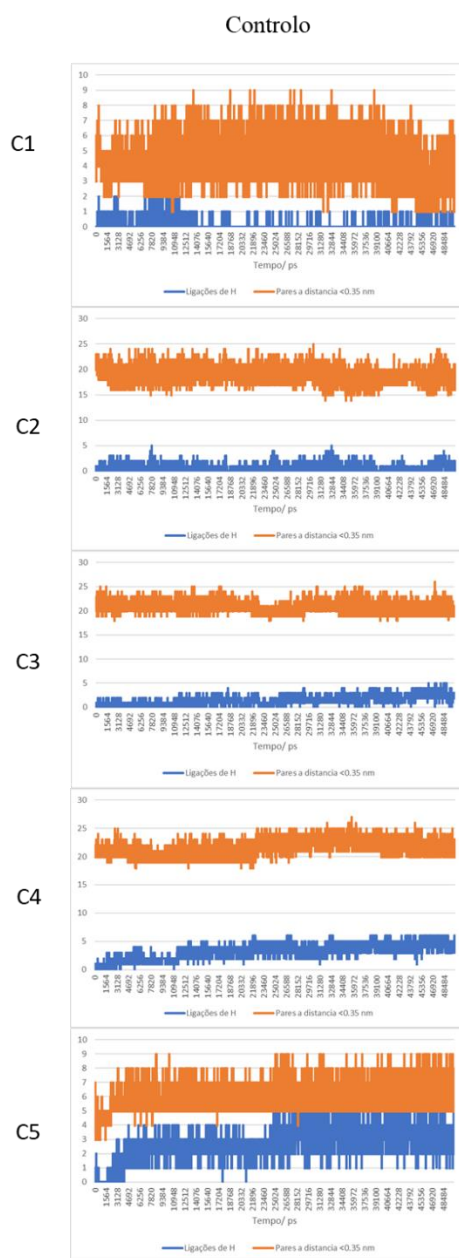
**Tabela A. 2** - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M de [Cho][Arg] e [Cho][Tos] nos sistemas com a proteína ovalbumina e água pH 2/PBS, respetivamente, com uma incerteza associada de  $\pm 0,05$  mg.

	Solução stock de ovalbumina / mg	Líquido iónico / mg	Água pH=2/ PBS / mg
Controlo	500,00	0,00	500,00
0,05 M [Cho][Arg]	500,00	14,00	486,00
0,5 M [Cho][Arg]	500,00	139,00	361,00
1 M [Cho][Arg]	500,00	278,00	222,00
0,05 M [Cho][Tos]	500,00	14,00	486,00
0,5 M [Cho][Tos]	500,00	140,00	360,00
1 M [Cho][Tos]	500,00	280,00	220,00

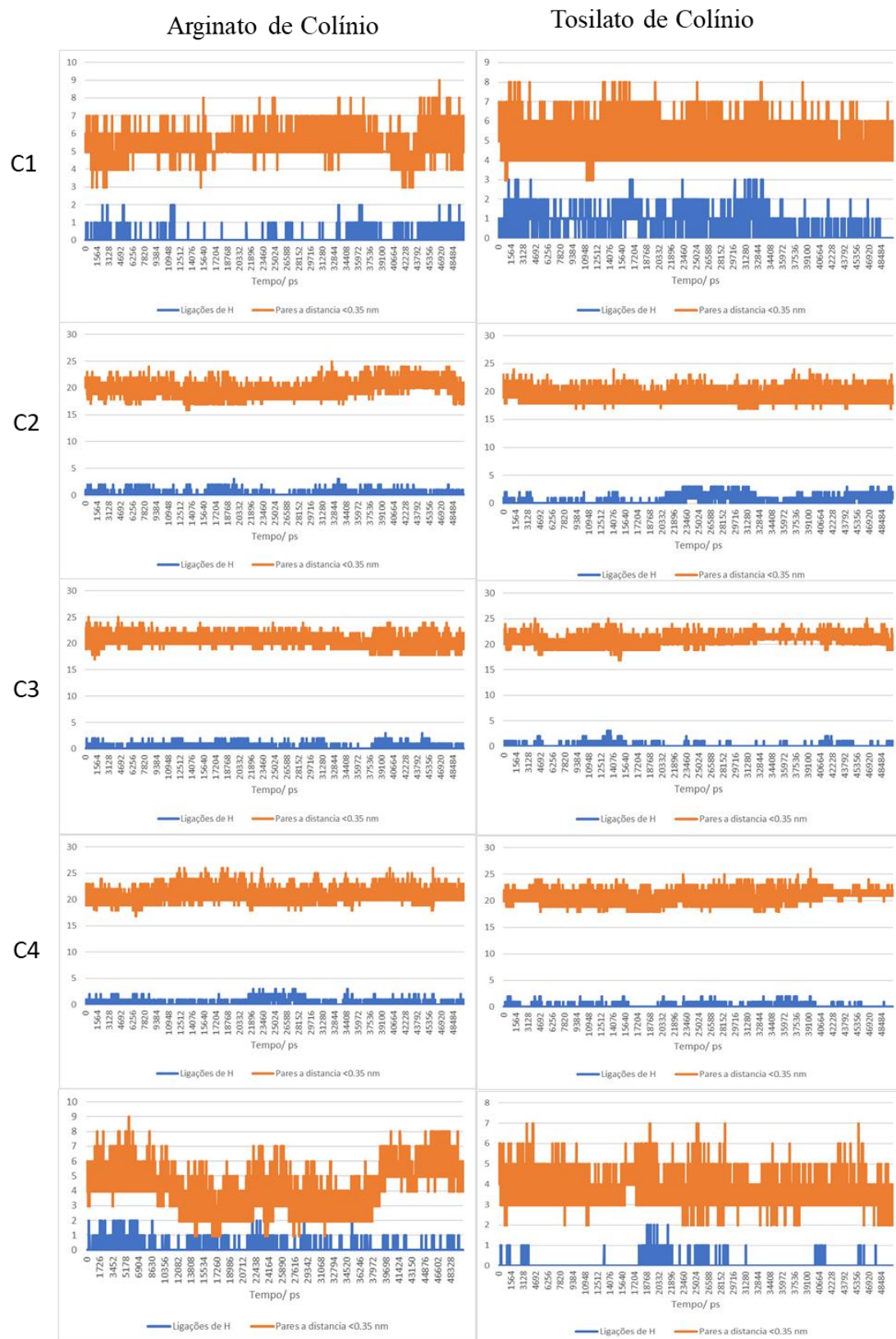
**Tabela A. 3** - Pesagens realizadas para obter as concentrações de 0,05, 0,5 e 1 M de Arginato de colínio nos sistemas com as proteínas totais da clara do ovo e água pH 2, com uma incerteza associada de  $\pm 0,05$  mg.

	Solução stock de proteínas totais da clara do ovo / mg	Líquido iónico / mg	Água pH=2 / mg
Controlo	500,00	0,00	500,00
0,05 M [Cho][Arg]	500,00	14,00	486,00
0,5 M [Cho][Arg]	500,00	139,00	361,00
1 M [Cho][Arg]	500,00	278,00	222,00

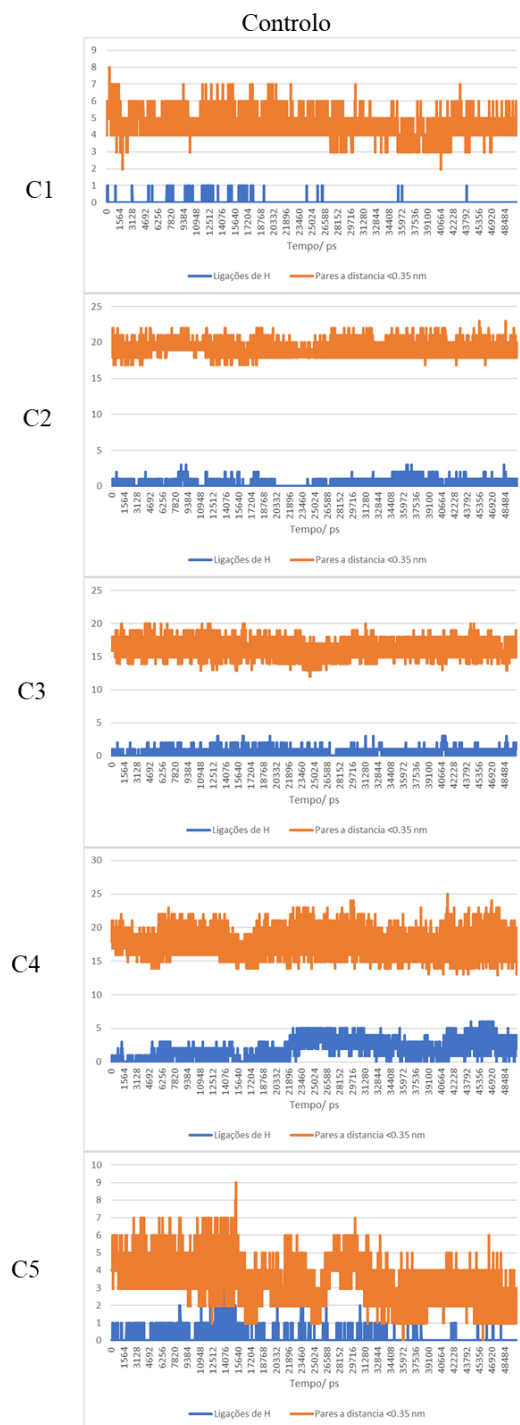
## Anexo B



**Figura B. 1** - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup>.

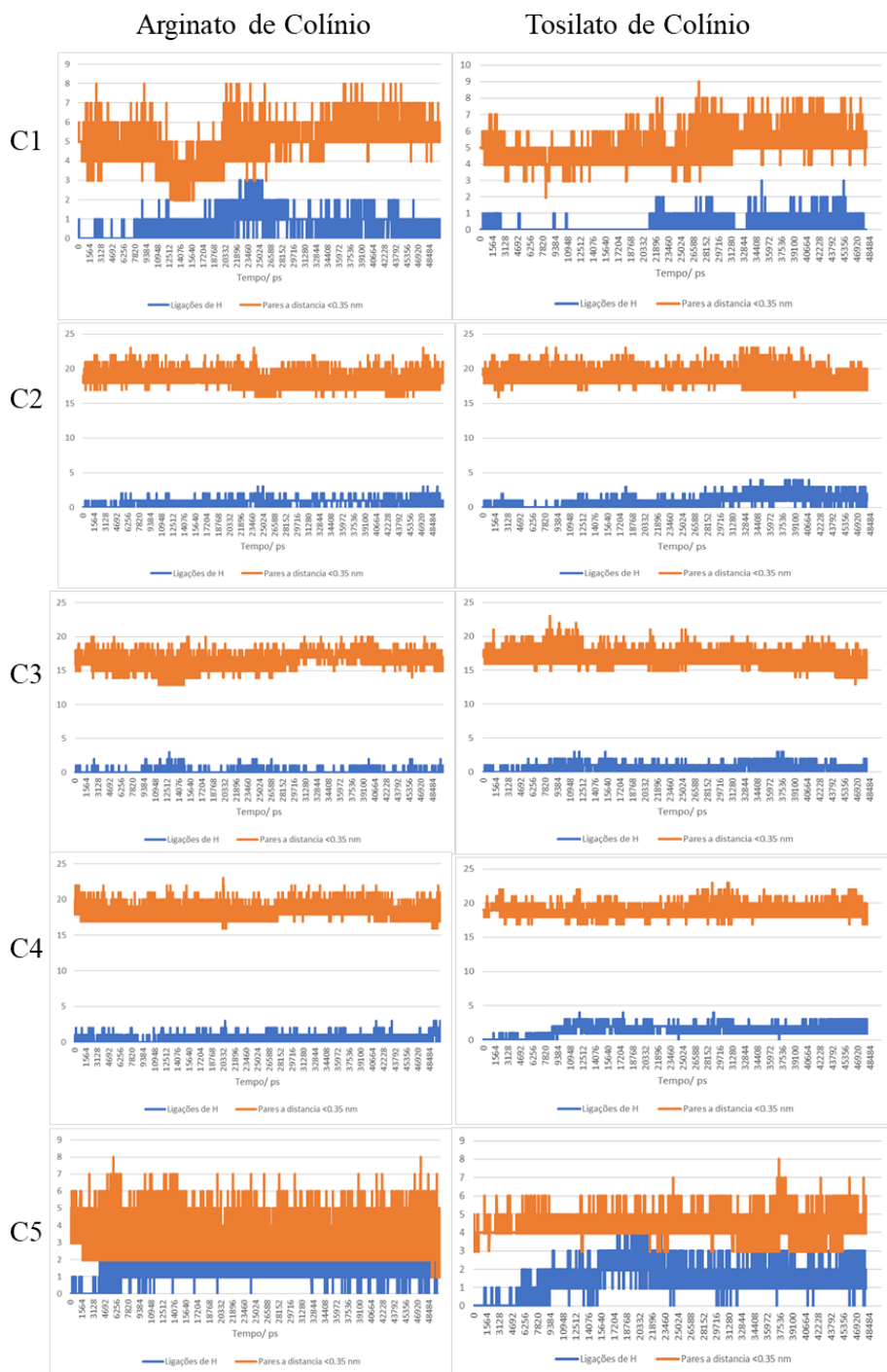


**Figura B. 2** - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para os sistemas com os dois líquidos iónicos do pentâmero constituído por <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup>.



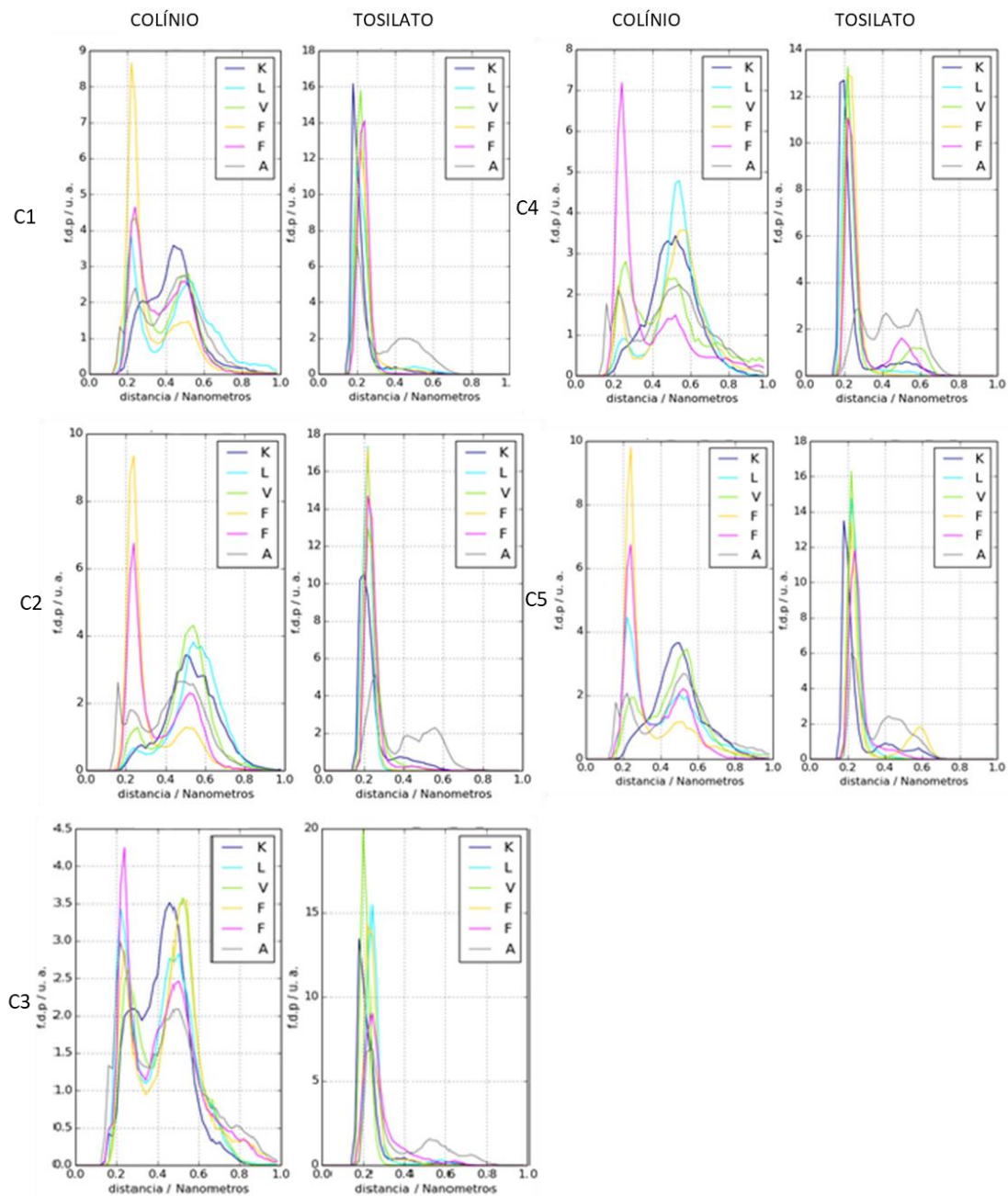
**Figura B. 3** - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para o sistema controlo do pentâmero constituído pela sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ .



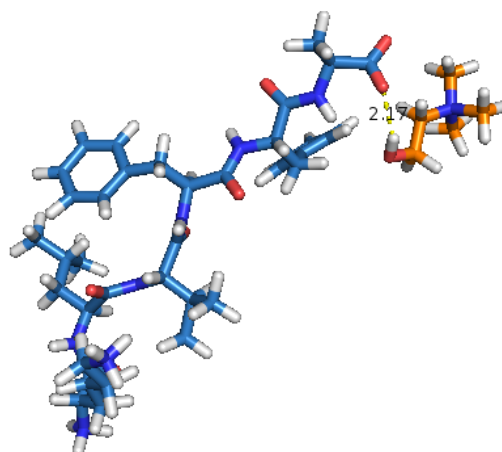


**Figura B. 4** - Número de ligações de hidrogénio e pares de átomos (aceitador e dador) a menos de 0,35 nm de distância para os sistemas com os dois líquidos iónicos do pentâmero constituído pela sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ .

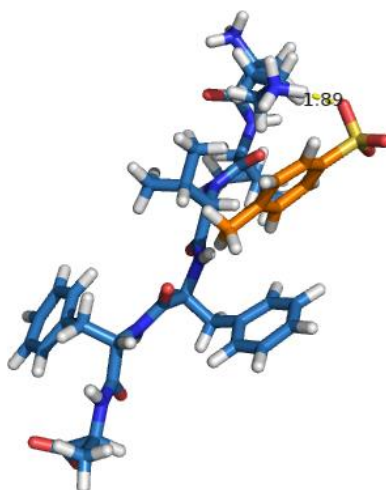
## Anexo C



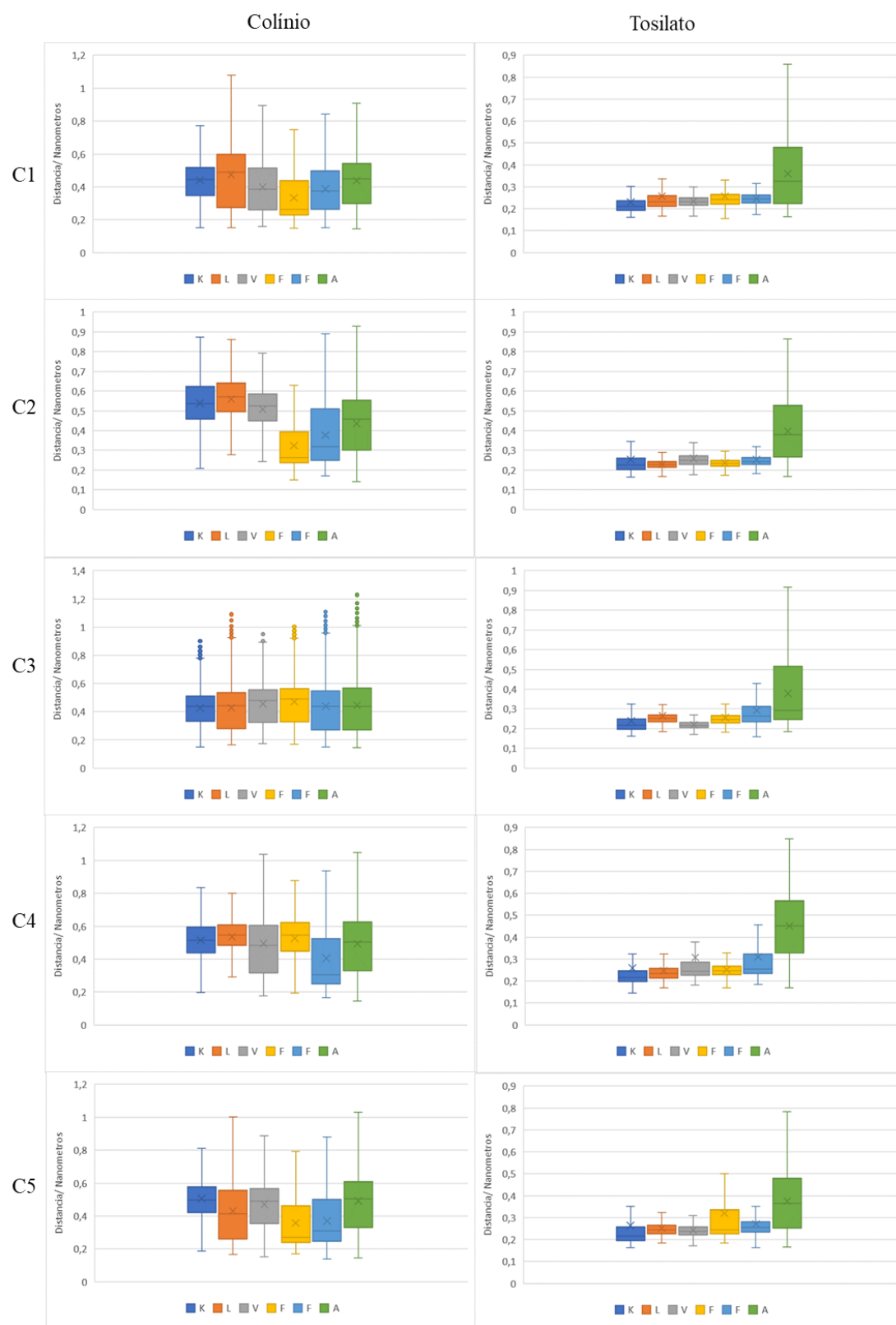
**Figura C. 1** - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência  $^{16}\text{KL VFFA}^{21}$  da proteína A $\beta$  e os componentes do líquido iônico, íons colínio e tosilato.



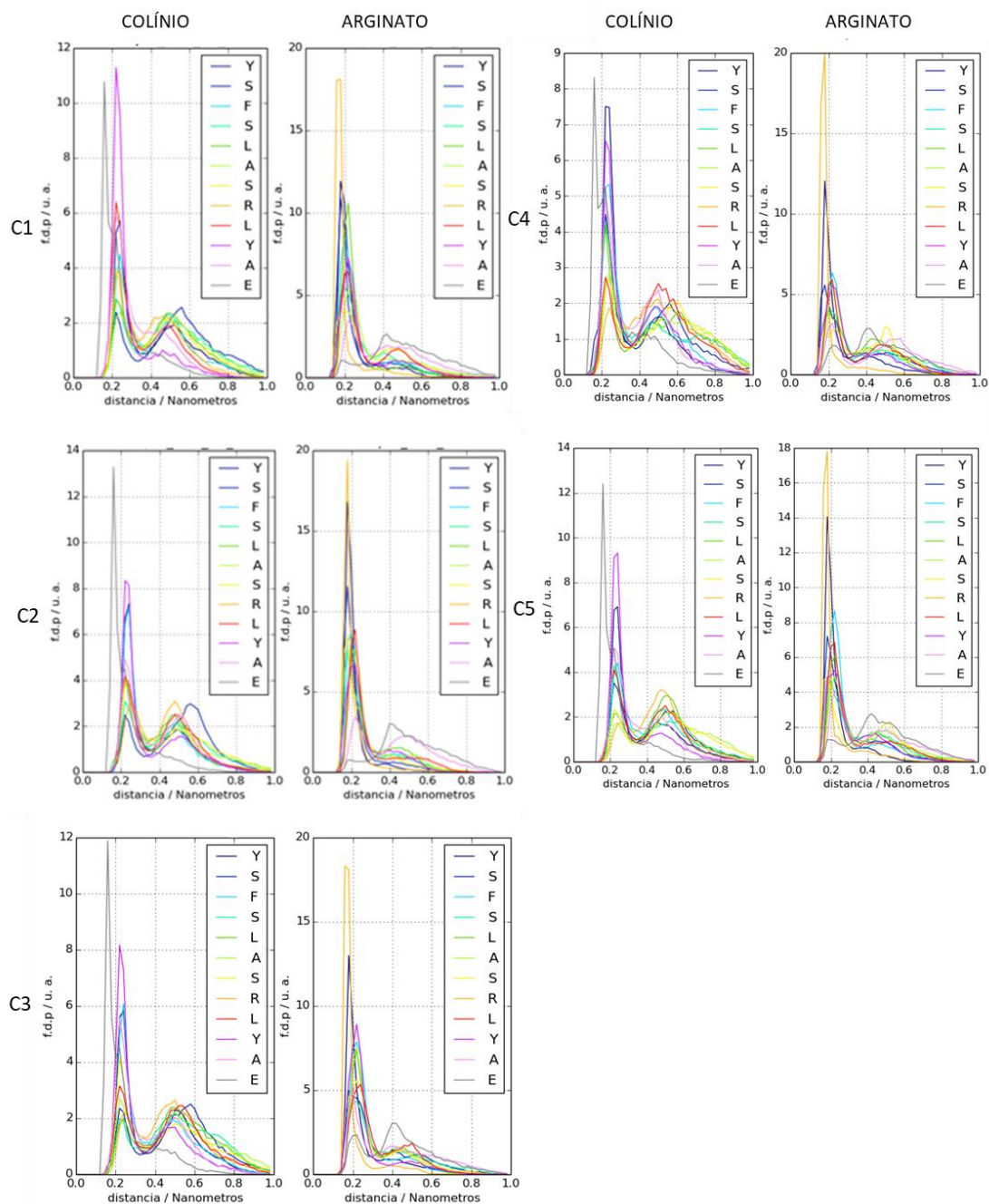
**Figura C. 2** - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido alanina da sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  (a azul) pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a alanina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).



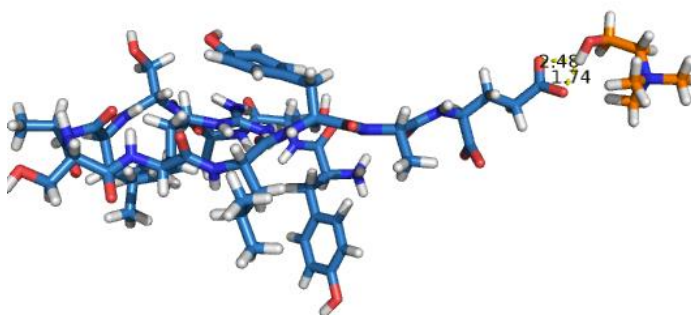
**Figura C. 3** - Distância em Å, entre o anião tosilato (a laranja) constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido lisina da sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  (a azul) pertencente à cadeia quatro do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião tosilato a laranja e para a lisina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



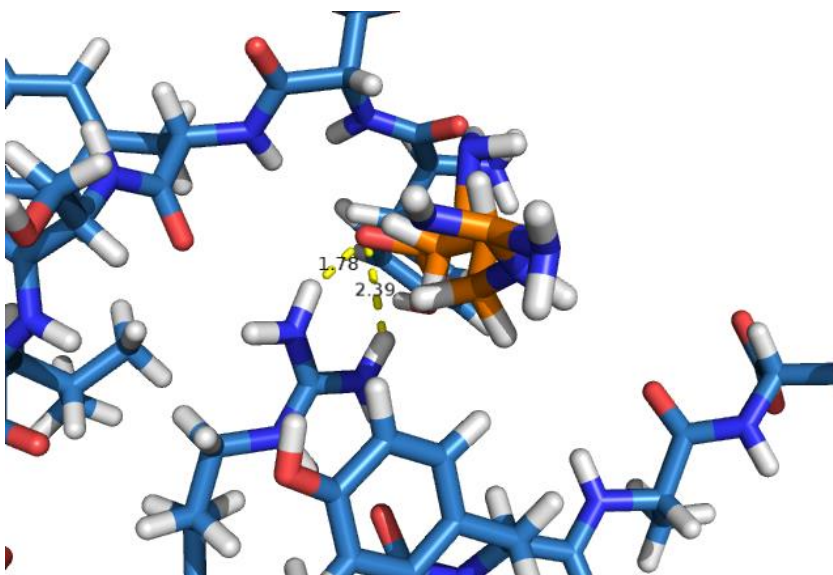
**Figura C. 4** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$  e os componentes de líquido iônico, íons colínio e tosilato.



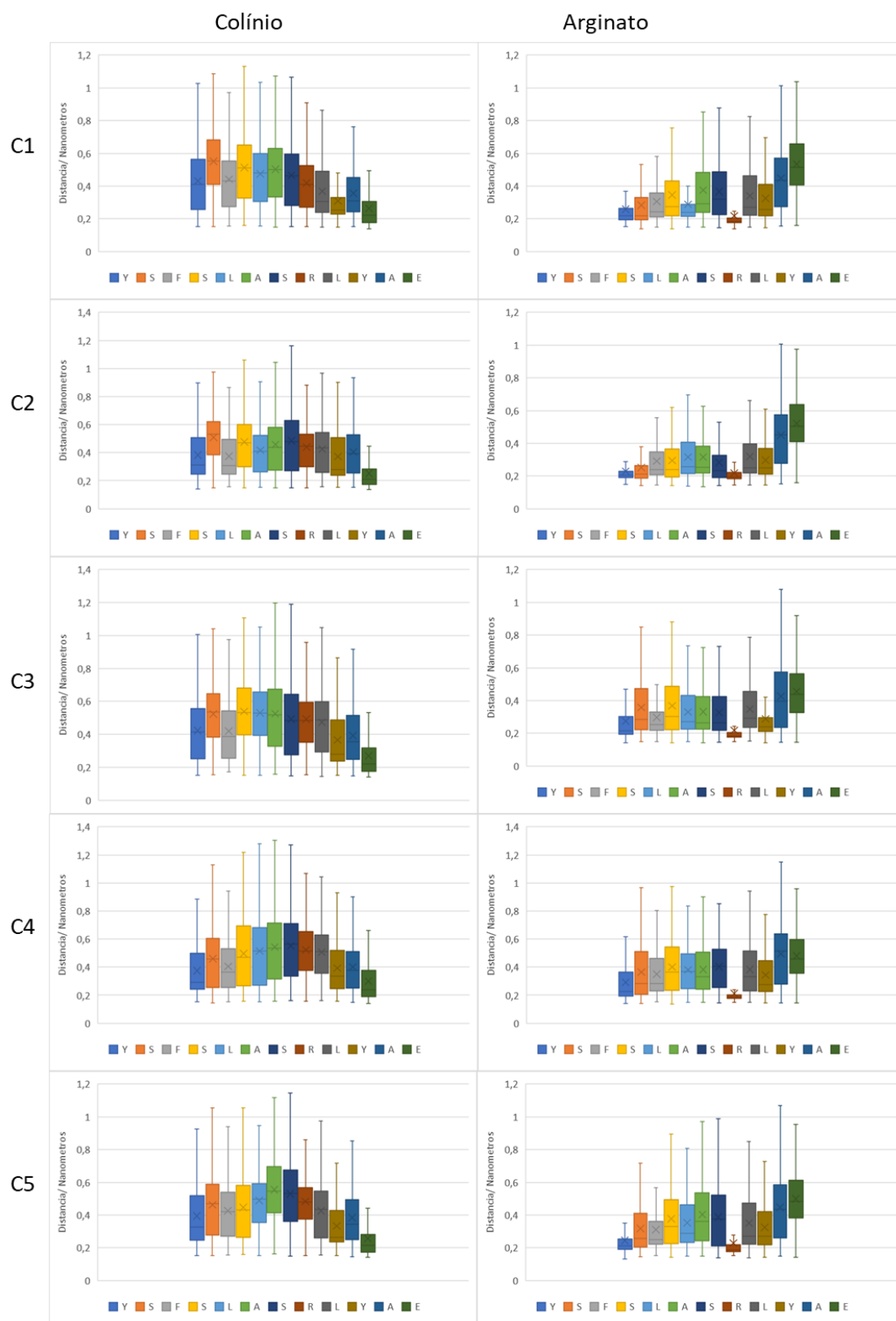
**Figura C. 5** - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  da ovalbumina e os componentes do líquido iônico, iões colínio e arginato.



**Figura C.6** - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido glutamato da sequência <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup> da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para o glutamato a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).

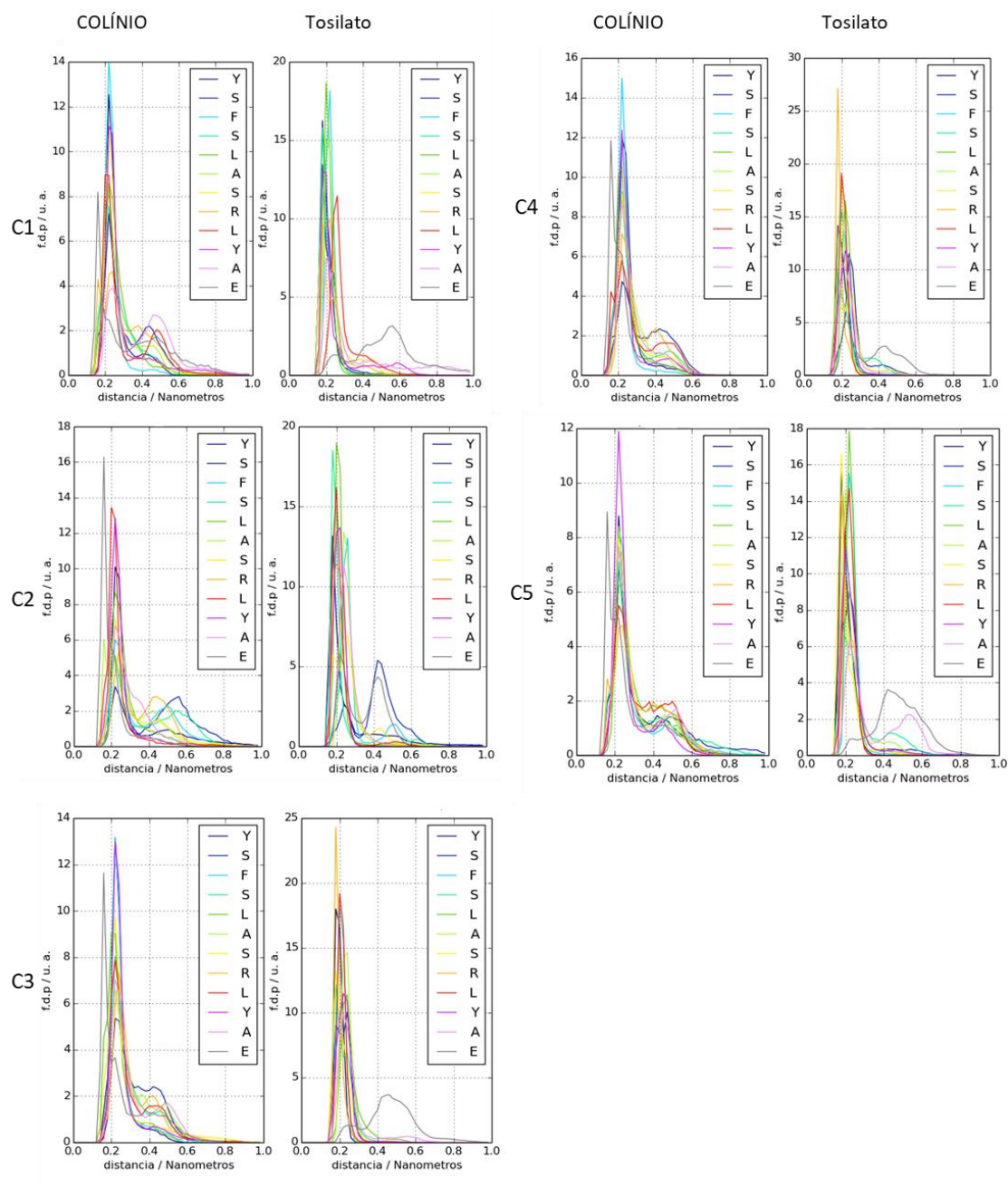


**Figura C. 7** - Distância apresentada em Å, entre o anião arginato (a laranja) constituinte do líquido iónico [Cho][Arg] e o aminoácido arginina da sequência <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup> da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião arginato a laranja e para a arginina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho).



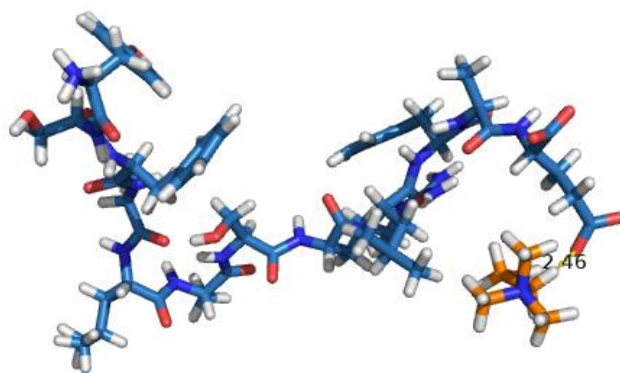
**Figura C. 8** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  da proteína ovalbumina e os componentes de líquido iônico, íons colínio e arginato.



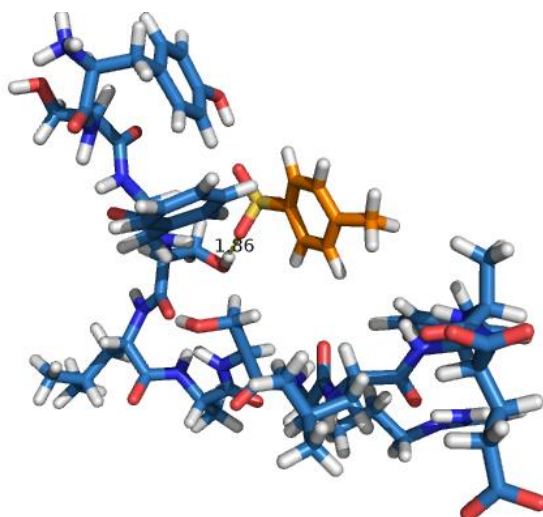


**Figura C. 9** - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  da proteína ovalbumina e os componentes do líquido iônico, íões colínio e tosilato.

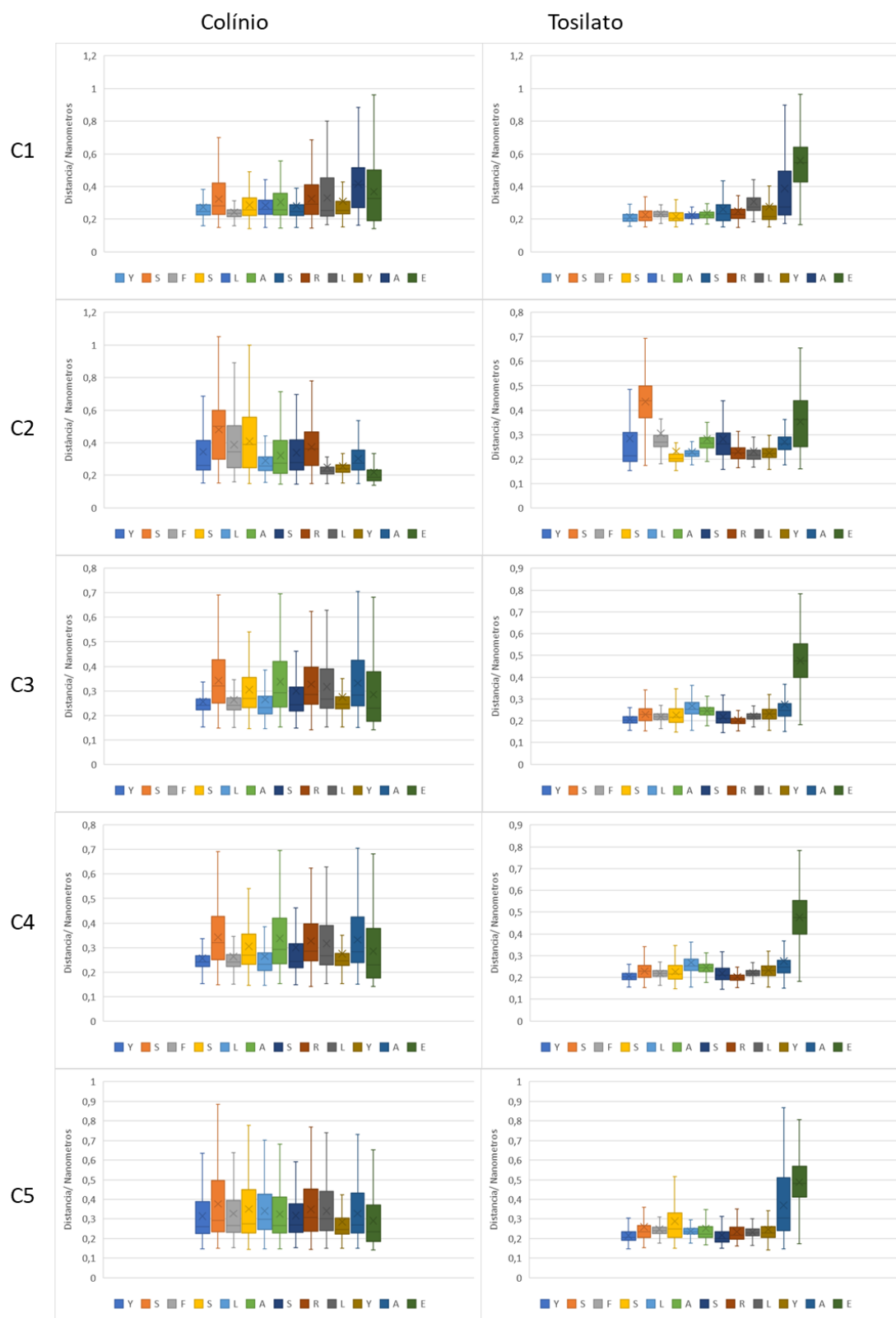




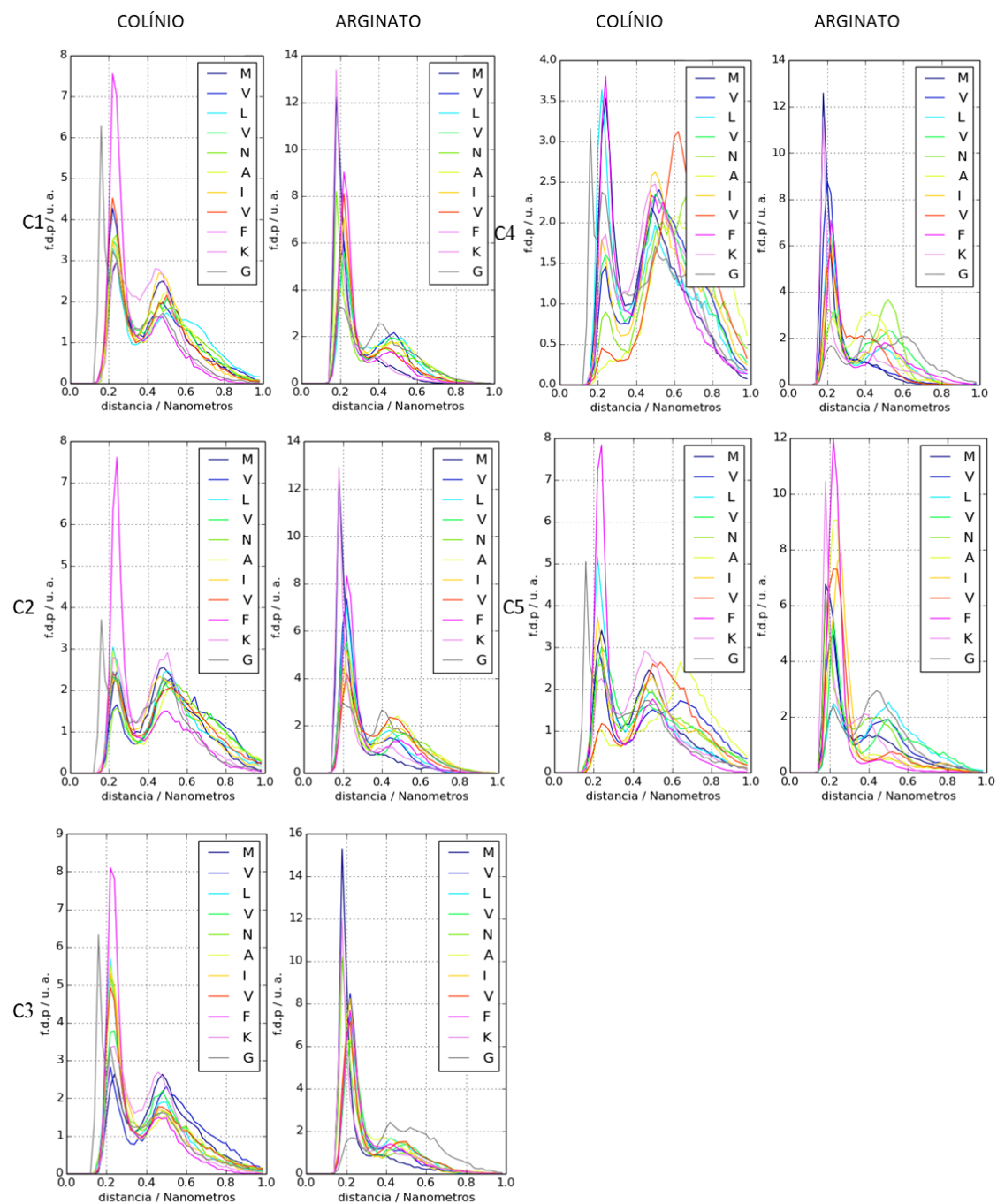
**Figura C. 10** - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido glutamato da sequência <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup> da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para o glutamato a azul, átomos de hidrogênio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigênio a vermelho).



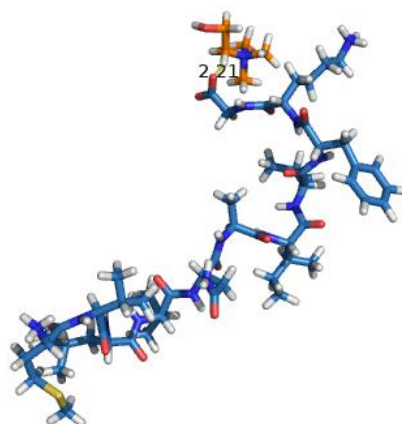
**Figura C. 11** - Distância em Å, entre o anião tosilato (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido serina da posição quatro da sequência <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup> da ovalbumina (a azul) pertencente à cadeia um do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o anião tosilato a laranja e para a serina a azul, átomos de hidrogênio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigênio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



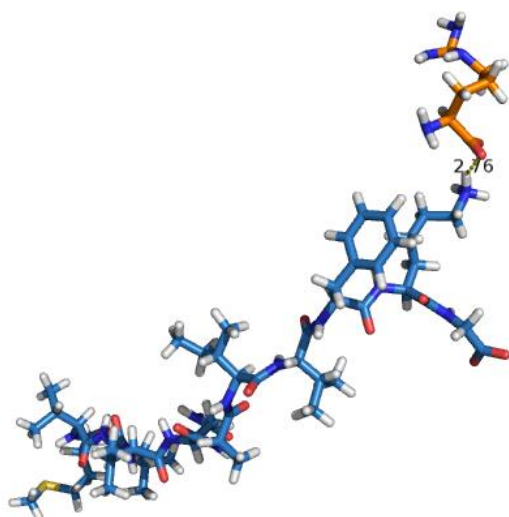
**Figura C. 12** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$  da ovalbumina e os componentes de líquido iônico, íons colínio e tosilato.



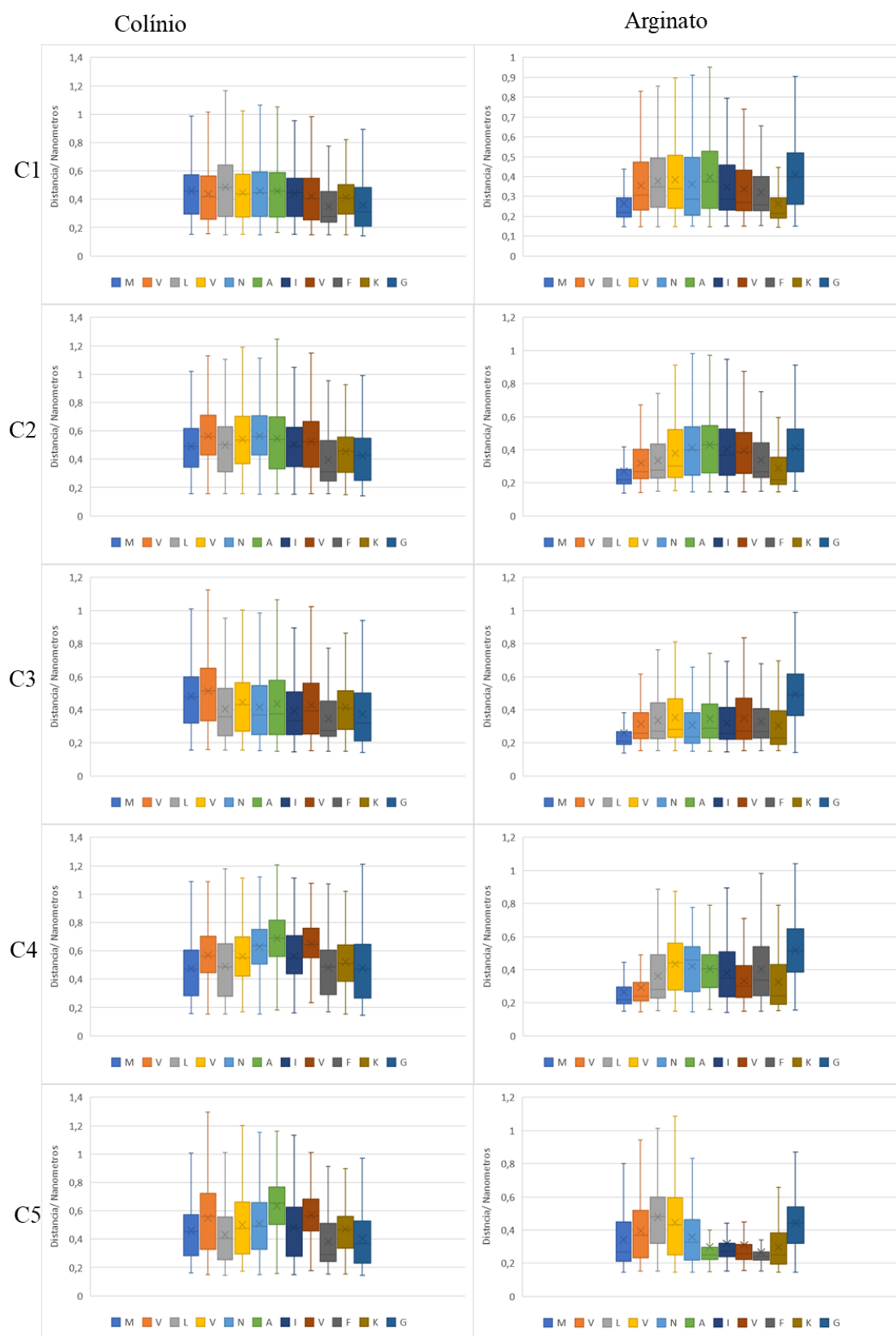
**Figura C. 13** -Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência<sup>173</sup>MVLVNAIVFKG<sup>183</sup> da proteína ovalbumina e os componentes do líquido iônico, íões colínio e arginato.



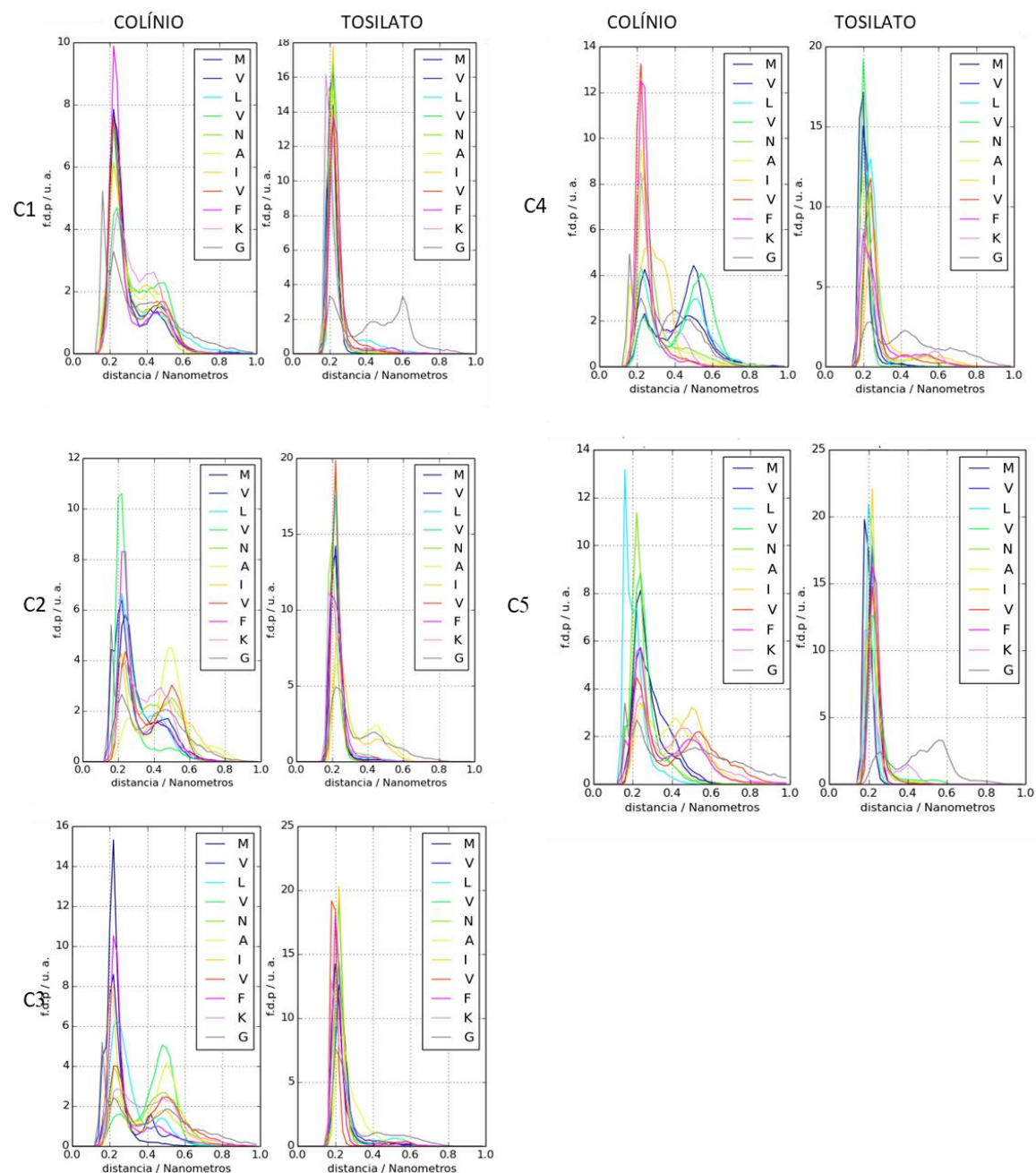
**Figura C. 14** - Distância em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Arg] e o aminoácido glicina da sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 50 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a glicina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



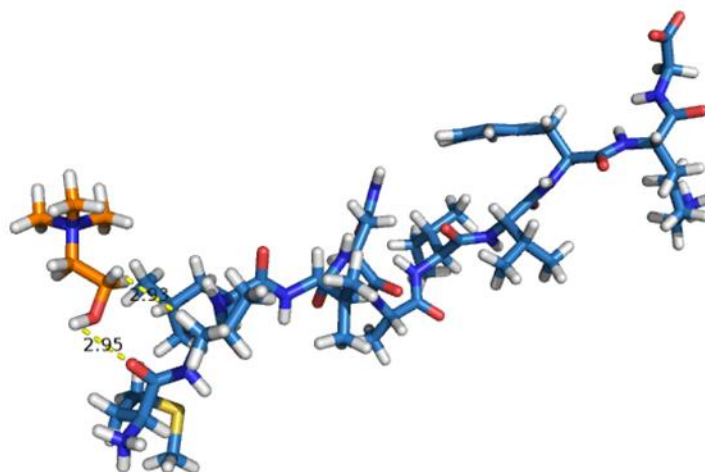
**Figura C. 15** - Distância em Å, entre o anião arginato (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Arg] e o aminoácido lisina da sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  (a azul) pertencente à cadeia 1 do pentâmero aos 50 ns de simulação (átomos de carbono para o anião arginato a laranja e para a lisina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul e átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



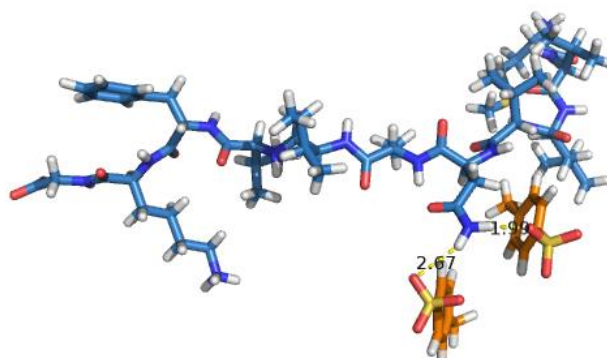
**Figura C. 16** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  e os componentes de líquido iônico, íões colínio e arginato.



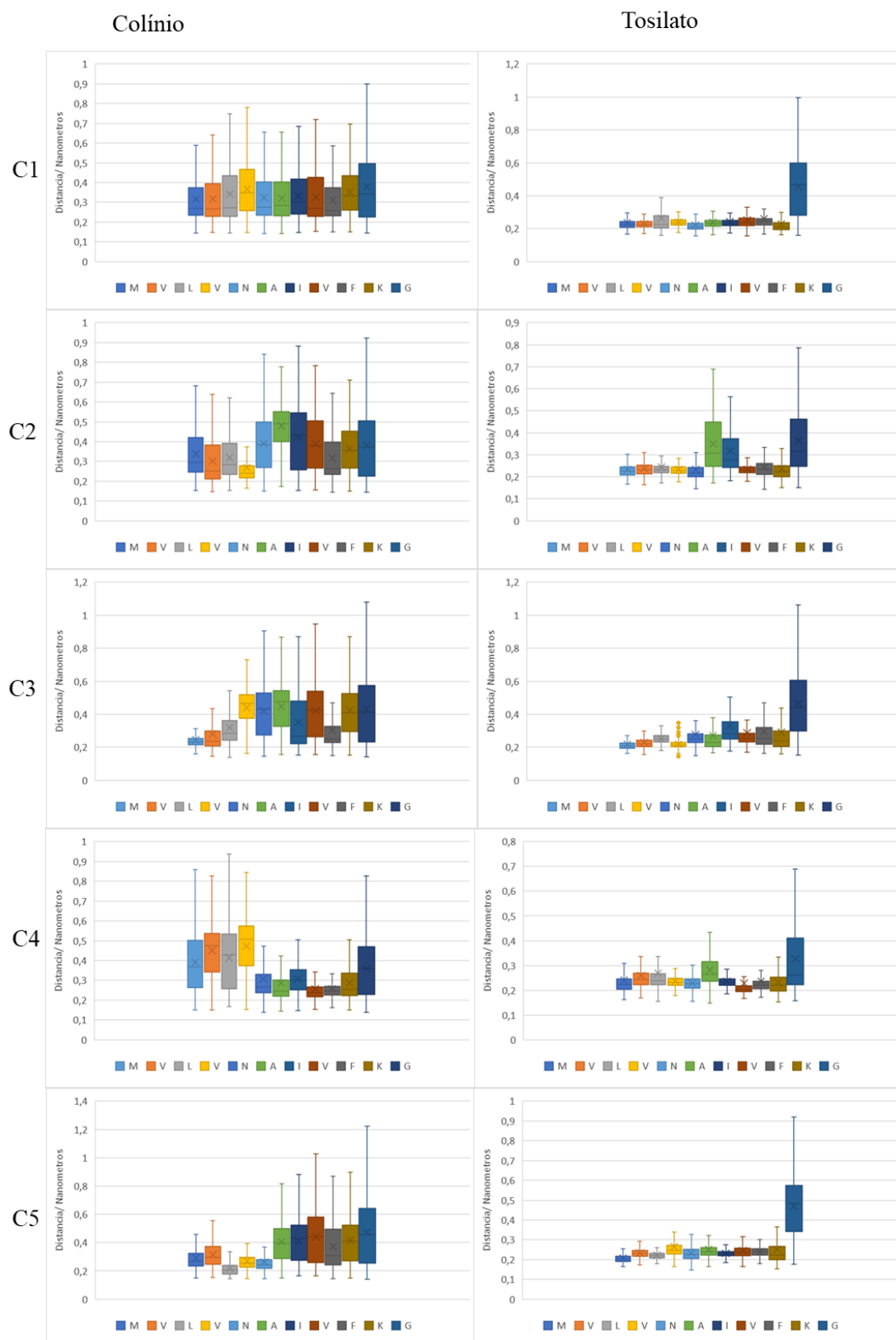
**Figura C. 17** - Gráficos da função da densidade de probabilidade da distância mínima entre os aminoácidos pertencentes à sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  e os componentes do líquido iônico, íons colínio e tosilato



**Figura C. 18** - Distância apresentada em Å, entre o catião colínio (a laranja), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e os aminoácidos valina e metionina da sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  (a azul) pertencente à cadeia dois do pentâmero, aos 46 ns da simulação (átomos de carbono para o catião colínio a laranja e para a valina e metionina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



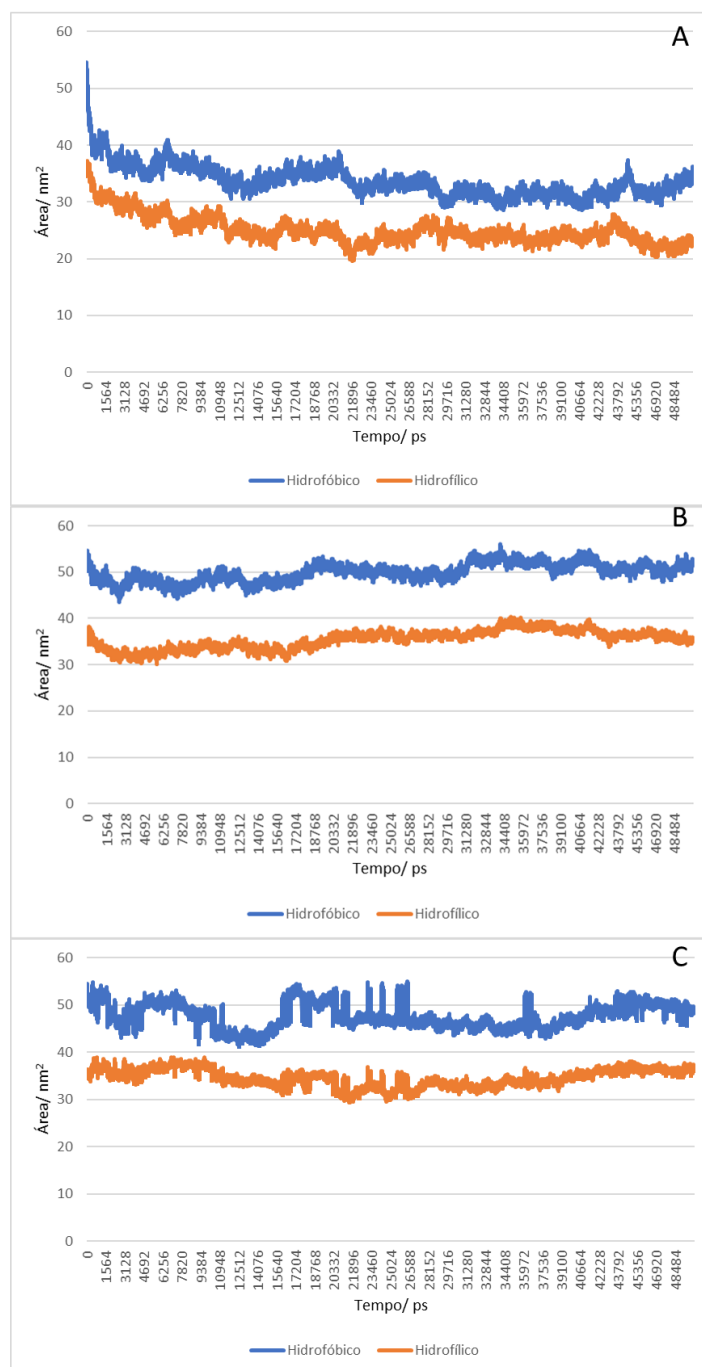
**Figura C. 19** - Distância apresentada em Å, entre dois aniões tosilato (a azul), constituinte do líquido iônico [Cho][Tos] e o aminoácido asparagina da sequência  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$  (a azul) pertencente à cadeia cinco do pentâmero, aos 46 ns da simulação (átomos de carbono para os aniões tosilato a laranja e para a asparagina a azul, átomos de hidrogénio a branco, átomos de azoto a azul, átomos de oxigénio a vermelho e átomos de enxofre a amarelo).



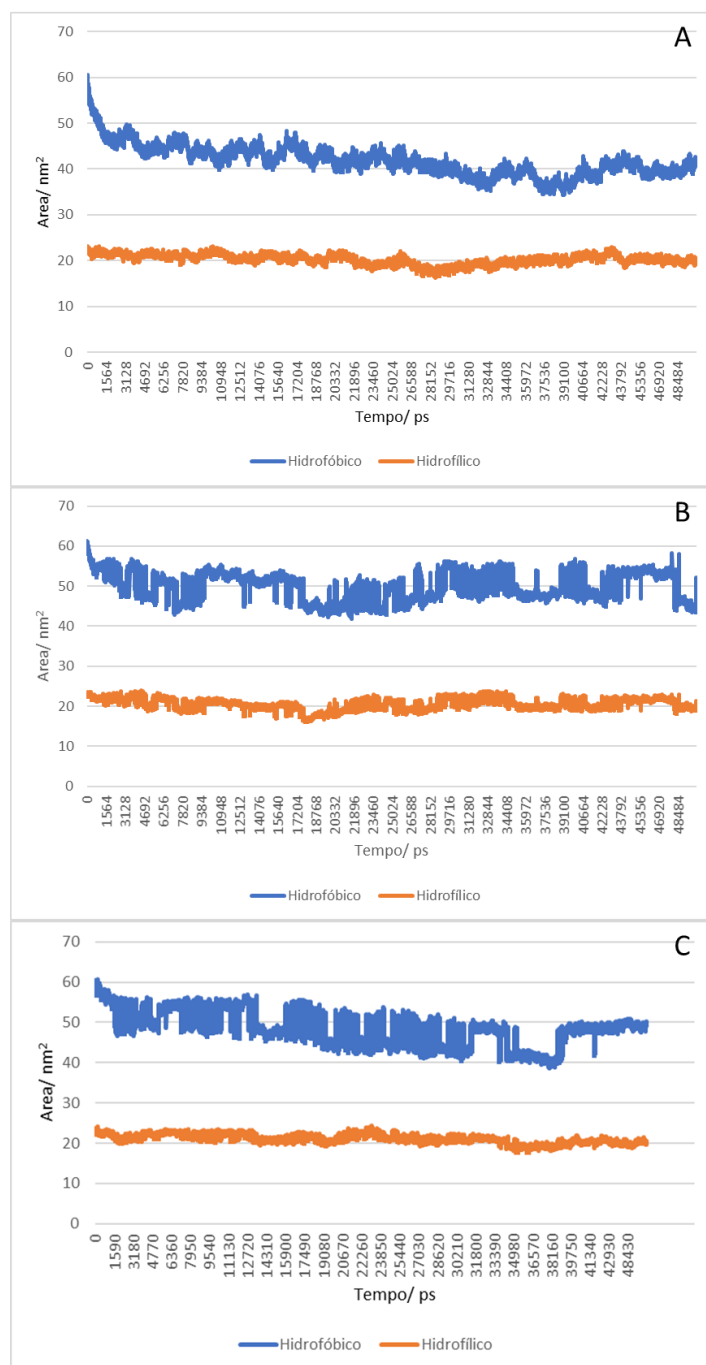
**Figura C. 20** - Diagramas de caixa e bigodes da distância mínima entre os aminoácidos da sequência  $^{173}\text{MVLVN AIVFKG}^{183}$  e os componentes de líquido iônico, íons colínio e tosilato.



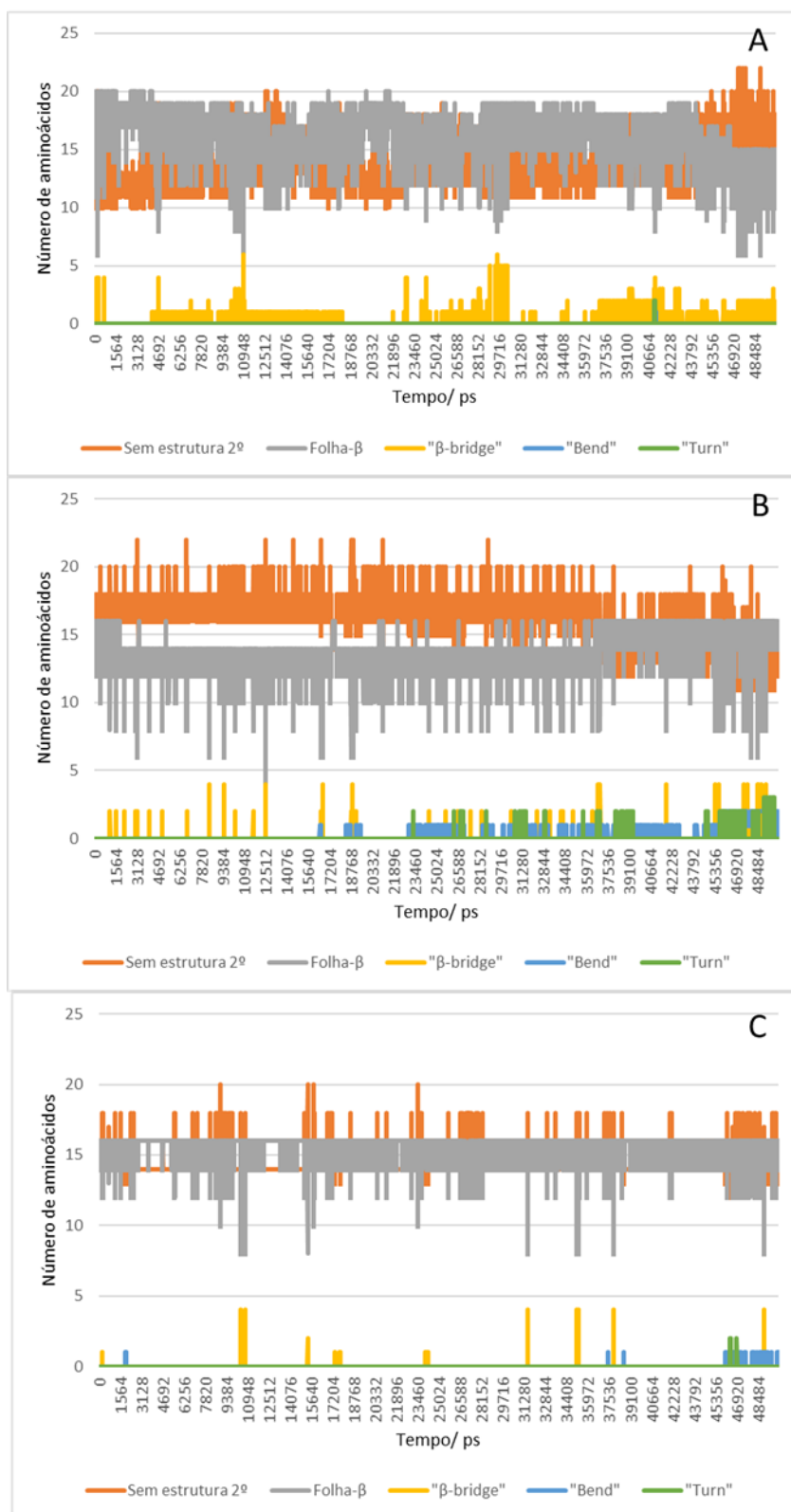
## Anexo D



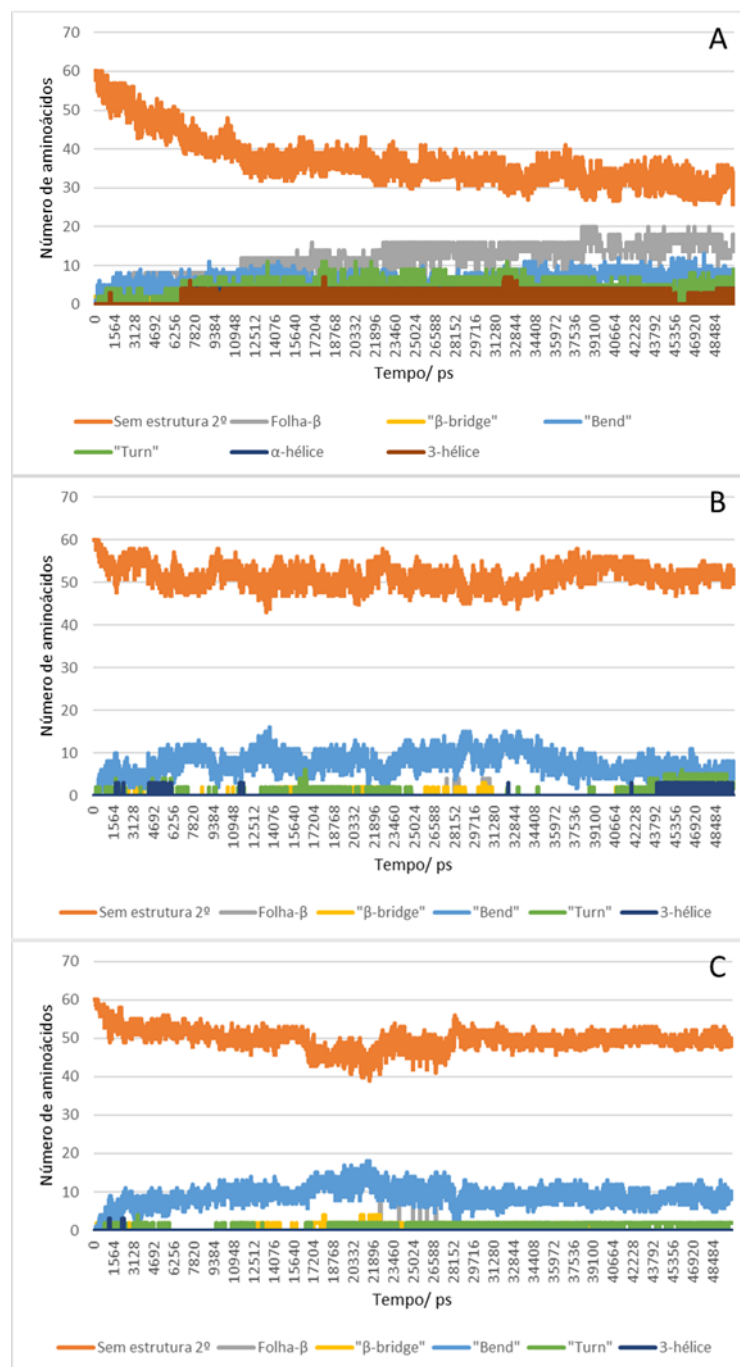
**Figura D. 1** - Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com <sup>98</sup>YSFSLASRLYAE<sup>109</sup>, A- para o sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], e C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].



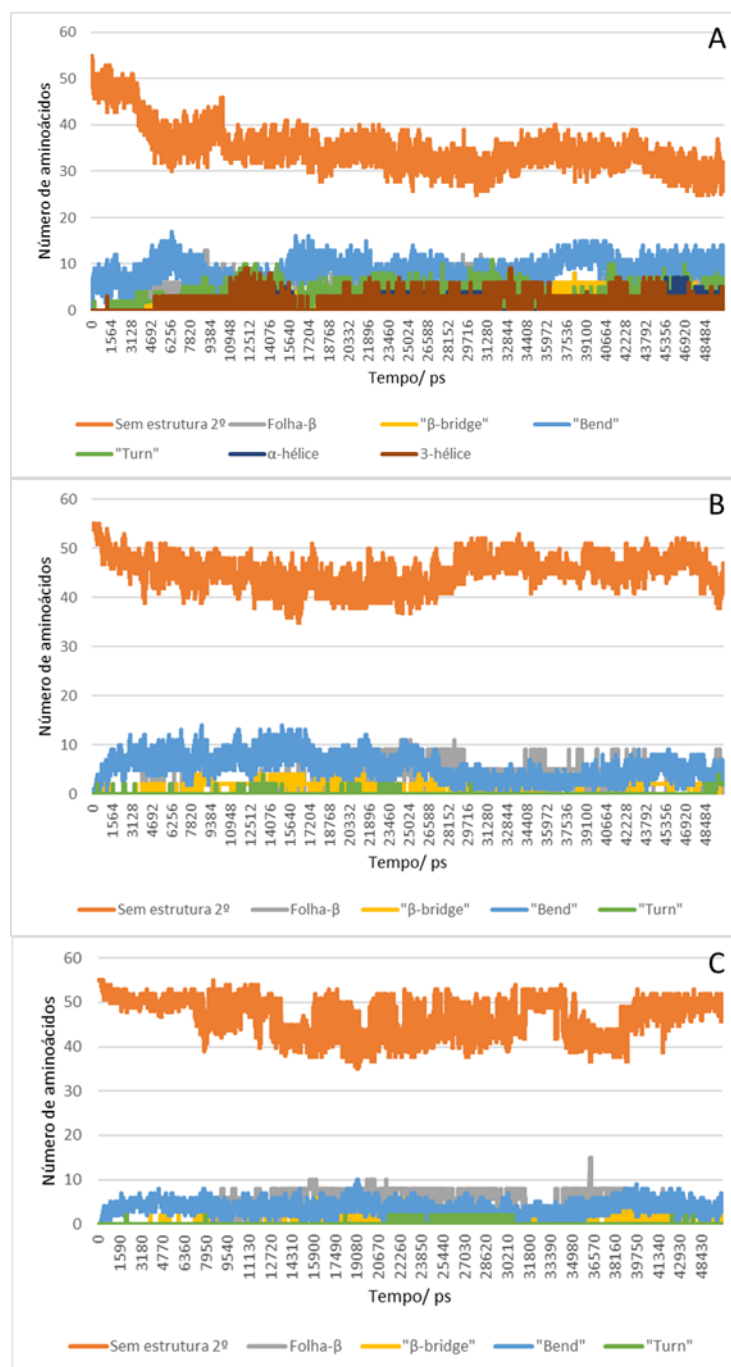
**Figura D. 2** - Área de superfície acessível ao solvente tendo em conta os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos do pentâmero com  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o [Cho][Tos].



**Figura D. 3** - DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências  $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].



**Figura D. 4** - DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências de  $^{98}\text{YSFSLASRLYAE}^{109}$ , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].



**Figura D. 5** - DSSP de todos os aminoácidos presentes no pentâmero constituído por sequências de  $^{173}\text{MVLVNAIVFKG}^{183}$ , A- sistema controlo, B- sistema com o líquido iónico [Cho][Arg], C- sistema com o líquido iónico [Cho][Tos].